

Aus dem Botanischen Institut der Technischen Hochschule Karlsruhe.

AUSLÖSUNG VON CHROMOSOMENMUTATIONEN
DURCH ÄTHYLURETHAN IN ABHÄNGIGKEIT
VON DER KONZENTRATION.

Von
JOSEF DEUFEL.

Mit 3 Textabbildungen.

(Eingegangen am 14. Januar 1952.)

A. Einleitung.

In Untersuchungen von OEHLKERS (1943) zeigte sich bei der Einwirkung von $AlCl_3$ auf die Meiosis, daß nicht, wie man vermuten könnte, die stärkste angewandte Konzentration auch die größte mutagene Wirkung hat. Diese erhöht sich vielmehr von $m/10$ — $m/10000$ und fällt dann wieder ab. Ähnliche Ergebnisse wurden durch $Al(NO_3)_3$ erhalten. Diese Versuche sind bisher die einzigen, die einen Hinweis geben, daß eine Beziehung der Mutationsrate zur Konzentration des mutationsauslösenden Mittels besteht. Nach Urethaneinwirkung zeigte sich dagegen bei der Meiosis (OEHLKERS 1943) keine Differenz zwischen verschiedenen Konzentrationen. Allerdings ist hier die Mutationsrate auch sehr gering, so daß ein größeres Zahlenmaterial vorliegen müßte, um exakte Aussagen machen zu können.

In der vorliegenden Arbeit soll nun die mutagene Wirkung verschiedener Urethankonzentrationen an der Mitose von *Vicia faba* untersucht werden. Die Mitose verspricht für diese Fragestellung günstiger zu sein als die Meiosis, denn bei dieser läßt sich auch ohne Zusatz von KCl zu Urethan ein höherer Prozentsatz an Mutationen als in der Meiosis erreichen (DEUFEL 1951). Man kann ziemlich sicher annehmen, daß irgendwelche Differenzen in der Mutationshäufigkeit auftreten, denn nach Untersuchungen von KOCHMANN (1923) hydriert Urethan in schwachen Konzentrationen, in starken dehydriert es dagegen.

B. Material und Methode.

Für diese Untersuchungen wurde *Vicia faba* ($2n = 12$) verwandt. Die Bohnen wurden in Petrischalen angekeimt und vom 3. Tag an in mit KNOPscher Nährlösung befeuchtetem Sägemehl weitergezogen. Nach weiteren 8 Tagen hatten sich genügend Seitenwurzeln gebildet um die Versuche zu beginnen. Hierzu wurden die Bohnen in 200 cm^3 Erlenmeyer-Kolben mit $1/10$, $1/25$, $1/50$, $1/100$, $1/1000$ und $1/10000$ molarer Lösung von Äthylurethan gebracht; als Kontrolllösung diente destilliertes Wasser. Nach 2stündiger Einwirkung wurden die Seitenwurzeln fixiert und gleichzeitig gefärbt. Hierzu wurde ein Gemisch aus CARNOY (3 Teile Alkohol + 1 Teil Eisessig) und Essigsäurekarmen im Verhältnis 2,5:1 verwandt.

C. Experimenteller Teil.

In der vorliegenden Arbeit sollen nur Chromosomenumbauten beschrieben werden und auf unspezifisch-physiologische Störungen braucht nicht weiter eingegangen werden, da diese schon früher untersucht und diskutiert wurden (DEUFEL 1951). Um ein recht großes Zahlenmaterial zu erhalten und um exakter vergleichen zu können, wurden jeweils 1000 Zellen analysiert, und zwar neben Metaphasen auch frühe und mittlere Anaphasen, da sich gerade in letzteren Chromosomenumbauten nicht nur zwischen Chromatiden, sondern auch an Halbchromatiden gut erkennen lassen. Achromatische Stellen auf den Chromosomen bleiben unberücksichtigt, denn diese treten in den Kontrollen fast ebensohäufig auf. Die in den folgenden Tabellen angegebenen Zahlen von Brüchen sind in Wirklichkeit höher, denn chromatidale und halbchromatidale Brüche manifestieren sich in der Metaphase in den weitaus meisten Fällen als mehr oder weniger breite achromatische Stellen auf den Chromosomen und können einwandfrei erst in der nächsten bzw. übernächsten Anaphase als Bruch erkannt werden. Daß aber Chromatid- wie auch Halbchromatidbrüche auftreten, ergibt sich aus der hohen Zahl gefundener Translokationen zwischen diesen Einheiten.

1. Die Häufigkeit der Chromosomenaberrationen in Abhängigkeit von der Konzentration des Äthylurethans.

In Tabelle 1 sind die nach Einwirkung von 6 verschiedenen Urethan-konzentrationen und der Kontrolle (H_2O) entstandenen Aberrationen aufgeführt. In Spalte 2 und 3 ist die Zahl der aberranten Zellen bzw. der gefundenen vollständigen Fragmente angegeben. Die bei der schwächsten Konzentration angegebenen Werte sind etwas mehr als doppelt so hoch wie die der Kontrolle. Die Zahl der Aberrationen steigt dann mit Zunahme der Konzentration bis $m/50$ Urethan und ist hier um das 5fache höher als in der Kontrolle und etwa doppelt so groß wie bei der niedrigsten Konzentration. Bei $m/25$ sind die Werte, obwohl nur

Tabelle 1. Häufigkeit der Aberrationen in Abhängigkeit von der Urethankonzentration.

Urethankonzentration	Analysierte Zellen	Aberrante Zellen	Fragmente	Translokationen	Brüche insgesamt	1				
						Brüche je Zelle				
						1	2	3	4	5
$m/10$	1000	85	103	12	123	58	18	7	2	
$m/25$	1000	83	78	24	119	50	30	3	—	
$m/50$	1000	147	149	44	227	77	60	6	3	
$m/100$	1000	104	87	39	162	54	43	6	1	
$m/1000$	1000	73	70	22	113	40	27	5	1	
$m/10000$	1000	70	67	13	91	50	19	1	—	
H_2O	1000	30	30	—	30	30	—	—	—	

eine sehr geringe Konzentrationsdifferenz zur nächst stärkeren Lösung besteht, um fast die Hälfte gesunken, betragen aber immer noch über das 2,5fache der Kontrolle. Bei der noch höheren Konzentration $m/10$ bleibt die Zahl der aberranten Zellen gleich wie bei $m/25$, während wieder mehr Fragmente auftreten. Chromosomenumbauten (Spalte 4) traten in der Kontrolle überhaupt nicht auf und wurden am meisten bei $m/50$ Urethan gefunden. Mit schwächer werdender Konzentration sinkt ihre Zahl bis auf $\frac{1}{3}$ bei $m/10000$. Wird die Konzentration stärker als $m/50$, so zeigt sich ebenfalls eine Abnahme der Translokationen. Zu bemerken ist noch, daß von $m/25$ — $m/10$ die Gesamtzahl der Brüche

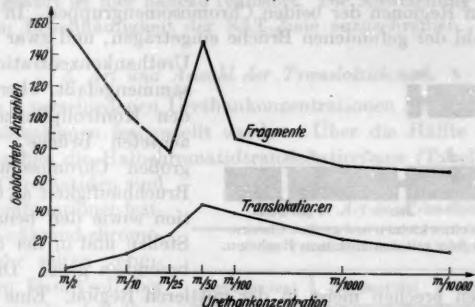


Abb. 1. Fragmente (oben) und Translokationen (unten) aller Urethankonzentrationen graphisch dargestellt.

gleich bleibt; dabei nehmen die Fragmente zu und die Translokationen ab. Dies wird noch deutlicher, wenn wir die Werte aus unserer früheren Arbeit (DEUFEL 1951) für $m/2$ Urethan noch hinzuziehen (Abb. 1). Bei dieser Konzentration ist die Zahl der Fragmente sehr groß (156) gegenüber nur 2 Translokationen.

Vergleicht man die entstandenen Brüche der einzelnen Konzentrationen insgesamt (Spalte 5), so ist das gleiche zu sagen wie bei den aberranten Zellen. Mit steigender Konzentration nimmt die Zahl der Brüche bis $m/50$ zu und sinkt bei den beiden stärksten Konzentrationen fast um die Hälfte.

Mehr als 4 Brüche je Zelle wurden niemals gefunden. Allerdings konnten bei $m/10$ Urethan einmalig Zellen festgestellt werden, in denen die Chromosomen fast restlos zerfallen waren, wie es schon früher beschrieben wurde (DEUFEL 1951).

Diese Ergebnisse zeigen deutlich, daß die stärkste Urethankonzentration nicht zugleich die größte mutagene Wirkung hat. Vielmehr ist für die Auslösung von Chromosomenmutationen in der Mitose von *Vicia faba* Urethan in einer Konzentration von $m/50$ am günstigsten, da hier die meisten Brüche und Rekombinationen auftreten.

Es sei noch erwähnt, daß bei den stärksten Konzentrationen die Chromosomen dicker und kürzer sind, während sie in den übrigen Lösungen etwa die gleiche Länge wie bei den Kontrollpflanzen besitzen. Verklebungen treten bei niederen Konzentrationen kaum auf, nehmen aber von m/50—m/10 sehr stark zu.

2. Verteilung der Brüche über die Chromosomen.

In diesen Untersuchungen wurden die Brüche nicht nur auf dem großen oder SAT-Chromosom wie in der früheren Arbeit (DEUFEL 1951), sondern auch auf die kleinen Chromosomen lokalisiert. Abb. 2 zeigt die einzelnen Regionen der beiden Chromosomengruppen. In Tabelle 2 ist die Anzahl der gefundenen Brüche eingetragen, und zwar von allen

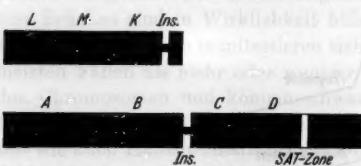


Abb. 2. Schema eines kleinen und großen Chromosoms von *Vicia faba* mit den einzelnen Regionen.

Urethankonzentrationen zusammengefaßt, ebenso die in den Kontrollpflanzen beobachteten Brüche. Auf dem großen Chromosom ist die Bruchhäufigkeit an der Insertion sowie den benachbarten Stellen und in der SAT-Zone besonders groß. Die kleinen

Chromosomen brechen meist in der mittleren Region. Eine Differenz gegenüber den früheren Untersuchungen wurde nicht gefunden. Die Zahl der Brüche ist in den Kontrollpflanzen verhältnismäßig niedrig, doch zeigt sich auch hier eine Tendenz zur Bevorzugung der gleichen Stellen wie nach Urethaneinwirkung.

Vicia faba besitzt haploid 5 kleine und ein großes Chromosom. Die kleinen sind alle gleich lang und das große genau doppelt so lang wie ein kleines Chromosom. Bei Annahme einer zufallsgemäßen Verteilung der Brüche müssen diese entsprechend den Längen der beiden Chromosomengruppen im Verhältnis 5:2 über die kleinen und großen Chromosomen verteilt auftreten. Wie in den früheren Untersuchungen wurde auch jetzt wieder eine bevorzugte Fragmentierung des großen Chromosoms gefunden (Tabelle 3). Die Abweichung von der Erwartung ist mit $P_{hom} < 0,001$ sehr gut gesichert. Läßt man bei Berechnung der Homogenität die fragmentierten Satelliten weg, so ist $P_{hom} > 0,50$ und das Verhältnis gebrochene kleine zu großen Chromosomen 4,74:2. Der

Tabelle 2. Lokalisierung der Brüche auf den Chromosomen.

	A	B	Insertion	C	D	SAT-Zone	Insertion	K	M	L	Σ
Urethan H_2O . .	9	55	88	51	3	141	77	97	273	41	835

Tabelle 3. Verteilung der Brüche über die beiden Chromosomengruppen.

	Σ der Fragmente	Kleine Chromosomen	Große Chromosomen	X^2	P_{hom}	Verhältnis kleine/große Chromosomen
Gefunden . .	835	488	347	68,95	$<0,001$	2,81:2
Erwartet . .						
	596,4	238,6				5:2
Ohne Satellit.						
Gefunden . .	694	488	206	0,42	$>0,50$	4,74:2
Erwartet . .						
	495,7	198,3				5:2

Erwartungswert ist hier nahezu realisiert. Die Abweichung ist also nur der großen Bruchhäufigkeit der SAT-Zone zuzuschreiben.

3. Art und Anzahl der Translokationen.

In den 6 verschiedenen Urethankonzentrationen konnten zusammen 154 Translokationen festgestellt werden. Über die Hälfte dieser Umbauten machen die Halbchromatidtranslokation aus (Tabelle 4). Auch zwischen Chromatiden sind viele Rekombinationen festzustellen, während chromosomal sehr selten gefunden wurden. Damit soll aber nicht gesagt sein, daß diese weniger häufig vorkommen.

Sie können nur dann einwandfrei erkannt werden, wenn ein Chromosom mit 2 Insertionsstellen auftritt oder wenn eines erheblich länger ist. Wie diese Untersuchungen zeigen, kommen Translokationen fast ausschließlich zwischen gleichen Chromosomenabschnitten — also wahrscheinlich zwischen im Ruhekern einander benachbarter Teile — vor. Bei einer reziproken chromosomal Translokation ist also selten eine Längenänderung eines Chromosoms festzustellen. Eine geringfügige Verlängerung eines Chromosoms braucht nicht unbedingt auf einer Translokation zu beruhen, sondern kann auf Spiralisationsstörungen zurückgehen. Rekombination zwischen — im Ruhekern — voneinander entfernter Teilen z. B. zwischen K und L oder K und A wurden in den ganzen Versuchen nur 6mal gefunden, alle übrigen traten zwischen benachbarten Teilen auf.

Translokation zwischen noch kleineren Einheiten als Halbchromatiden konnten nicht sicher erkannt werden, da hierzu das Auflösungsvermögen des Mikroskops zu schwach ist. Es ist aber anzunehmen, daß solche vorkommen und verschiedene Beobachtungen deuten auch auf ihr Vorhandensein hin. Abb. 3 zeigt uns einen Ausschnitt aus einer frühen Anaphase, in der auf einem kleinen Chromosom in der Region M

Tabelle 4. Art der Translokationen.

Σ der Translokationen 154, davon sind		
chromosomal	chromatidal	halbchromatidal
6	67	81

ein Bruch entstand und anschließend eine Rekombination zwischen Halbchromatiden eintrat. Bei genauer Betrachtung des Bildes zeigen sich in der Bruchstelle noch zwei sehr feine dünne Linien. Man kann diese auf Verklebungen zurückführen, aber viel wahrscheinlicher ist, daß es sich hier um eine Translokation zwischen noch kleineren Einheiten als Halbchromatiden handelt, denn derartige Bilder wurden öfters in den Versuchen mit niederen Konzentrationen beobachtet und in diesen sind Verklebungen sehr selten.

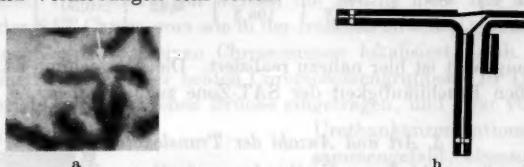


Abb. 3a u. b. Ausschnitt aus einer frühen Anaphase. Halbchromatidtranslokation und Rekombination zwischen Viertelschromatiden. a Photo, 2500mal vergr.; b Schema dazu.

Translokationen fanden in den allermeisten Fällen zwischen 2 Chromosomen statt (Tabelle 5). Umbauten innerhalb eines einzelnen Chromosoms sind nur etwa $\frac{1}{4}$ mal so häufig zu finden. Ein-Bruchrestitutionen wurden in kleinen wie auch großen Chromosomen gefunden, während 2-Bruchrestitutionen innerhalb eines Chromosoms nur in den großen auftraten. 2-Bruchrestitutionen fanden jeweils zwischen den Abschnitten B und C oder A und B statt, also zwischen Teilen, die im Ruhekern benachbart sind.

Tabelle 5. *Restitutionsergebnisse.*

Chromosomenumbauten		
in 1 Chromosom		zwischen 2 Chromosomen
1-Bruchrestitution	2-Bruchrestitution	
26	5	123

D. Theoretischer Teil.

In der Meiosis werden durch Urethan allein fast keine Mutationen ausgelöst. Einen hohen Prozentsatz, den Veränderungen nach Bestrahlung vergleichbar, erhält man aber bei Kombination von Urethan mit KCl (OEHLKERS 1943). Bei den Versuchen an der Meiosis werden die Infloreszenzen abgeschnitten und in die zu prüfende Lösung gestellt. Es ist hier also viel weniger als bei den Mitoseversuchen zu kontrollieren, wieviel von den einzelnen Chemikalien — insbesondere bei Kombinationsversuchen — bis zu den Pollenmutterzellen vordringt. In der Mitose wird durch KCl die Mutationsrate gegenüber Urethan allein nicht nennenswert erhöht (DEUFEL 1951). Dies ist sicher darauf zu-

rückzuführen, daß bei diesen Versuchen die Wurzeln, die ja direkt behandelt werden, sich erst in Nährlösung befinden und dann in das schädigende Agens umgesetzt werden. Es sind also genügend Salze — KCl und besonders Ca, das sich in unseren früheren Untersuchungen als sehr wirksam in Kombination mit Urethan erwies — ungebunden in den Zellen, um mit Urethan zusammen wirken zu können. Um also die mutagene Wirkung von Urethan in Abhängigkeit von seiner Konzentration zu prüfen, eignet sich die Mitose bedeutend besser. Daß diese wirklich von der Urethankonzentration abhängt, zeigen die Versuche dieser Arbeit.

1. Urethanwirkung in Abhängigkeit von der Konzentration.

KOCHMANN (1923) stellte an Fibrinflocken fest, daß Urethan in schwachen Konzentrationen hydriert und in starken dehydriert. Er fand die höchste quellungsfördernde Wirkung bei $m/4$ und den Beginn der Dehydratation bei 2 m Urethan.

Auch in unseren Untersuchungen fallen 2 Konzentrationen besonders heraus; einmal $m/50$ mit der größten mutagenen Wirkung und $m/25$ mit Beginn der Chromosomenverkürzung, Abnahme der Translokationen und Zunahme der Brüche. Daß keine Übereinstimmung der Konzentrationen mit den Ergebnissen von KOCHMANN gefunden wurden, kann man darauf zurückführen, daß das Urethan sich stark in den Zellen der Wurzelspitzen anreichert und hier vielleicht eine Konzentration erreicht, wie KOCHMANN sie angibt. Auch spielen sicher noch eine Menge anderer Salze eine Rolle und es wäre gut denkbar, daß sich deshalb schon bei niederen Urethankonzentrationen die höchste hydrierende und der Beginn der dehydrerenden Wirkung zeigt.

Jedenfalls tritt klar hervor, daß schwache Urethankonzentrationen — also eine hydrierende Wirkung — für die Auslösung von Chromosomenmutationen bedeutend günstiger sind als starke Konzentrationen und die damit verbundene Dehydratation. Mit Beginn der entquellenden Wirkung bei $m/25$ treten zwar mit zunehmender Konzentration wieder mehr Brüche auf, aber diese sind nun seltener in der Lage zu restituieren. Man kann annehmen, daß hier die Brüche trotz der stark dehydrerenden Wirkung zwar auf dieselbe Art erfolgen wie in den niederen Konzentrationen, daß aber die Moleküle an den Bruchflächen deformiert oder sogar ganz zerstört werden, so daß diese nicht mehr in der Lage sind mit anderen Bruchflächen zu rekombinieren. Es sind also nicht allein die Konzentration, sondern auch der physiologische Zustand der Zellen und Kerne für das Auftreten von Restitutionen und Rekombinationen verantwortlich zu machen.

Nach Einwirkung der verschiedenen Urethankonzentrationen treten bei den Translokationen nur quantitative aber keine qualitativen Unter-

schiede auf. In allen Fällen können auch hier die Chromosomenumbauten auf Bruch und Wiedervereinigung der einzelnen Teile zurückgeführt werden. Sie treten um so häufiger auf, je näher die einzelnen Chromosomen während des Bruch-Rekombinationsvorganges beieinanderliegen, wie es schon OEHLKERS, LINNERT und STANGE (1951) feststellten.

2. Bruchverteilung über Genom und Chromosomen.

Wie früher (DEUFEL 1951) fand sich auch in den jetzigen Untersuchungen nach Urethaneinwirkung keine gleichmäßige Bruchverteilung über das Genom, sondern es erfolgte wieder eine Verschiebung des Bruchverhältnisses von 5:2, wie man es den Längen der beiden Chromosomengruppen entsprechend erwarten muß, zugunsten der SAT-Chromosomen und diese Verlagerung konnte wieder auf die große Bruchhäufigkeit der SAT-Zone zurückgeführt werden. Diese ist auch während der Teilung völlig nucleinsäurefrei und es ist möglich, daß deswegen an dieser Stelle Urethan viel leichter angreifen und die chemische Struktur verändern kann. Um diese Stelle zu brechen genügt vielleicht schon allein die Hemmung des Nucleinsäurestoffwechsels, der ja von hier aus induziert wird. Eigenartig ist auch, daß die SAT-Zone nie an einer Translokation beteiligt ist. Dies ist wahrscheinlich auf den unterschiedlichen Bau der SAT-Zone und der übrigen Chromosomenteile zurückzuführen.

Auch bei den einzelnen Chromosomen sind die Brüche nicht gleichmäßig über ihre ganze Länge verteilt. Die kleinen Chromosomen brechen bevorzugt in der Mitte, wie es früher schon angedeutet wurde (DEUFEL 1951). Einen ähnlichen Befund teilt auch FORD (1949) in einer kurzen Arbeit mit. Er fand nach Senfgaseinwirkung auf *Vicia faba* nur in der medianen Region der kleinen Chromosomen Brüche. Von den großen Chromosomen ist in dieser Mitteilung leider überhaupt nicht die Rede. Bei diesen treten in unseren Untersuchungen die Brüche meist, wie vorhin schon erwähnt wurde, in der SAT-Zone, sowie der Insertion und dieser benachbarten Stellen auf. Ein bevorzugtes Brechen der Insertion nach Urethaneinwirkung fand auch GOTTSCHALK (1951) bei *Solanum lycopersicum*. Es ist möglich, daß die Insertionsstelle auf Grund ihres chemischen Feinbaues (GOTTSCHALK 1951), oder auch weil sie während der ganzen Teilung nucleinsäurefrei bleibt und deshalb für Urethan besser angreifbar ist, sehr viel leichter bricht als andere Stellen. Für die insertionsnahen Stellen trifft diese Erklärung allerdings nicht zu. Man kann das Brechen hier vielleicht auf die Unterschiede im Bau des Chromosoms zurückführen, denn bei *Vicia faba* folgt unmittelbar auf die Insertion, und zwar in beiden Schenkeln ein kleines Stückchen Euchromatin, darauf ein ebenso kleines Stück Heterochromatin und dann sind die Chromosomenschanken zum größten Teil euchromatisch. Vielleicht

erfolgen nun gerade an den Nahtstellen von Eu- zu Heterochromatin die Brüche, wie es auch MARQUARDT (1951) nach Zephiorolbehandlung und Bestrahlung von *Oenothera* vermutet. Man kann annehmen, daß an diesen Orten die Bindungen lockerer sind und deshalb hier die Brüche gehäuft auftreten. Es könnte aber auch sein, daß an diesen Nahtstellen eine besonders große chemische Aktivität herrscht (vgl. SAT-Zone), die durch Urethan gestört wird und daß deshalb das Chromosom hier leichter bricht. Auch die kleinen Chromosomen besitzen in der medianen Region, in der die meisten Brüche auftreten, ein kleines Stückchen Heterochromatin und das Brechen an dieser Stelle könnte auf dieselbe Ursache wie bei den großen Chromosomen zurückgeführt werden.

3. Chromosomenumbauten nach Urethaneinwirkung und Bestrahlung.

Nach MARQUARDT (1950), OEHLKERS und LINNERT (1951) und GORTSCHALK (1951) muß die Art und Weise, die nach Urethaneinwirkung und nach Bestrahlung zum Bruch und zur Rekombination führt, auf beide Einwirkungen hin die gleiche sein. Beide Eingriffe müssen also eine gleichartige zellphysiologische Störung verursachen, die sich auf die Chromosomen auswirkt. Da durch Urethaneinwirkung die Peroxyd-spaltung gehemmt wird (WARBURG 1928), d. h. also in den Zellen H_2O_2 frei wird und da nach Bestrahlung ebenfalls Peroxyde auftreten (vgl. MARQUARDT 1950 und die dort zitierte Literatur), so kann man annehmen, daß das Mutationsgeschehen wenigstens teilweise auf die Peroxydwirkung zurückzuführen ist; weiterhin auch auf Veränderungen im Nucleinsäurestoffwechsel, die bei beiden Einwirkungen im Rahmen der unspezifisch-physiologischen Störungen an den Chromosomen und in der Zelle festgestellt werden können.

In der vorliegenden Arbeit wurden meist chromatidale und halb-chromatidale Chromosomenumbauten gefunden. Chromosomale traten sehr selten auf. Auch eine Viertelschromatidtranslokation konnte festgestellt werden. Daraus läßt sich schließen, daß auch bei *Vicia faba* die Chromosomen in der Metaphase zumindest aus 8 Längselementen bestehen.

Nach Bestrahlung konnte diese Wirkung auf Unterteilungen der Chromosomen nicht gefunden werden (DEUFEL 1951). Diese Feststellung bestätigte sich auch bei anderen Objekten und anderer chemischer Einwirkung und Bestrahlung: AUERBACH und ROBSON (1947) nach Senfgasbehandlung und Bestrahlung von *Drosophila*, OEHLKERS und MARQUARDT (1950) an *Paeonia* nach Urethan- und Röntgeneinwirkung, MARQUARDT (1951) an *Oenothera* nach Zephiorleinwirkung und Bestrahlung.

Zusammenfassung.

1. Es wurde die mutagene Wirkung von Äthylurethan in Abhängigkeit von der Konzentration geprüft.
2. Die meisten Chromosomenmutationen traten bei m/50 Urethan auf und nicht, wie man erwarten könnte, bei noch stärkeren Konzentrationen.
3. Translokationen traten fast ausschließlich zwischen Chromatiden und Halbchromatiden auf; chromosomale Umbauten sind selten. Auch zwischen Viertelschromatiden wurde eine Rekombination gefunden.
4. Translokationen zwischen 2 Chromosomen treten meist nur zwischen solchen Teilen auf, die im Ruhekern oder in der frühen Prophase einander benachbart liegen.
5. Bei der Bruchverteilung über das Genom werden die Satellitenchromosomen bevorzugt, was auf die große Bruchfreudigkeit der SAT-Zone zurückgeführt wird.
6. Die Bruchverteilung über die Chromosomen erfolgt nicht zufallsgemäß. Auf den kleinen Chromosomen brechen meist die mittleren Regionen, während auf den großen Chromosomen die SAT-Zone, sowie die Insertion und dieser benachbarten Stellen bevorzugt sind.

Literatur.

AUERBACH, C., and J. M. ROBSON: The production of mutations by chemical substances. Proc. Roy. Soc. Edinburgh, B 62, 271 (1947). — DEUFEL, J.: Untersuchungen über den Einfluß von Chemikalien und Röntgenstrahlen auf die Mitose von *Vicia faba*. Chromosoma 4, 239—272 (1951). — FORD, C. F.: Chromosome breakage in nitrogen mustard treated *Vicia faba* root tip cells. Proc. Eighth Int. Congr. Genetics 1949, 570—571. — GOTTSCHALK, W.: Der Vergleich von Röntgen- und chemisch induzierten Chromosomenmutationen im Pachytan von *Solanum lycopersicum*. Chromosoma 4, 342—358 (1951). — KOCHMANN, H.: Einfluß der Narkotica der Fettreihe auf den Quellungszustand der Zellkolloide. Biochem. Z. 186, 49 (1923). — MARQUARDT, H.: Neuere Auffassungen über einige Probleme aus der Pathologie der Kernteilung. Naturwiss. 37, 416—424, 433—438 (1950). — Die Auslösung von Chromosomenmutationen durch Röntgenstrahlen und durch die Invertseife. Zephirol in der Meiosis von *Oenothera Hockeri*. Z. Abstammungslehre 83, 513—530 (1951). — OEHLKERS, F.: Die Auslösung von Chromosomenmutationen in der Meiosis durch Einwirkung von Chemikalien. Z. Abstammungslehre 81, 313—341 (1943). — OEHLKERS, F., u. G. LINNERT: Weitere Untersuchungen über die Wirkungsweise von Chemikalien bei der Auslösung von Chromosomenmutationen. Z. Abstammungslehre 83, 429—438 (1951). — OEHLKERS, F., G. LINNERT u. L. STANGE: Die Häufigkeit experimentell durch Röntgenstrahlen und Chemikalien induzierter Chromosomenumbauten auf den unterscheidbaren Anteilen der *Oenothera*-Genome in der Meiosis. Z. Abstammungslehre 83, 479—484 (1951). — OEHLKERS, F., u. H. MARQUARDT: Die Auslösung von Chromosomenveränderungen durch Injektion wirksamer Substanzen in die Knospen von *Paeonia tenuifolia*. Z. Abstammungslehre 83, 299—317 (1950). — WARBURG, O.: Die katalytischen Wirkungen der lebendigen Substanz. Berlin 1928.

Dr. JOSEF DEUFEL, Botanisches Institut der Technischen Hochschule, Karlsruhe, Kaiserstraße 2.

From the Institute of Clinical Medicine (Director: Prof. L. VILLA) and the Institute of Genetics (Director: Prof. Cl. BARIGOZZI) of the University of Milano.

THE ISOLATED CHROMOSOMES FROM ERYTHROCYTES OF VARIOUS SPECIES OF VERTEBRATES.

By
E. E. POLLI.

With 2 figures in the text.

(Eingegangen am 15. September/24. November 1951.)

The study of the chromatin during the resting stage of nuclei aims at revealing the structure of chromosomes at the time when they control the characters of the cell and participate in cell metabolism. Such knowledge of the chromosome cycle will be of interest both for the normal and the pathological aspects of cell life.

The investigation of erythrocyte chromatin in non-mammalian vertebrates was begun by MIRSKY and coll. (1943—1951) using new techniques in the microscopical and chemical analysis of nuclear structure. According to these authors, the nucleus of erythrocytes (salmon and domestic fowl) contains an intermingled mass of chromonemata. When the nuclear membran is destroyed, the chromatin threads often are isolated, showing several features typical for chromosomes. These are: (1) a longitudinal split (mainly visible at the extremities of some threads), (2) a longitudinal differentiation into blocks when stained with the Feulgen reaction, (3) the constant presence of primary and, sometimes, secondary constrictions.

CLAUDE and POTTER (1943) were the first to isolate from mammalian nuclei chromatin threads which they described as longitudinally double structures showing a zonal differentiation. That the threads are spiralled was later on confirmed by HOVANITZ (1947) and HOVANITZ et al. (1947) by means of the electron microscope. CALVET et al. (1948), however, supported the view that the filaments obtained with a Waring blender were nuclear fragments because of their resemblance with detritus resulting from nuclei when exploded in vacuum. PFEIFFER (1950) using the MIRSKY technique on muscle explants and other somatic cells of *Calliphora erythrocephala* obtained two-armed chromatic filaments with a primary constriction constantly Feulgen negative, and with some secondary constrictions. The author concludes that the filaments are true chromosomes from interphasic nuclei. More recently, LAMB (1950) has expressed an opposite opinion denying the chromosomal nature of the filaments for the following reasons: the threads are too long or too

short to be interphasic chromosomes; the longitudinal split when observed with the electron microscope does not seem to be real; some filaments are completely Feulgen negative; operating at low speed gives longer filaments than at high speed. Ris and MIRSKY (1951), however, brought forward new arguments in favor of their view that the isolated filaments are real chromosomes: the constancy of morphological characters of the filaments even when obtained by using different techniques; the Feulgen stainability, the presence of filaments associated with nucleoli. Recently YASUZUMI et al. (1951) pointed out that for structural reasons the filaments must be considered as chromosomes, although there remained some uncertainty as to their stainability with the Feulgen technique.

Personal investigations (1951) had already convinced me that the chromatin threads isolated from resting nuclei of normal and pathological human blood cells looked like chromosomes, but it seemed necessary to collect more data for a definite proof. A paper by TAMINI (1944) had given evidence that in different species of vertebrates there is a relation between mitotic and interphasic chromosomes. For the present investigation the following points have been chosen as a task: (1) whether the filaments show general chromosome characters, such as longitudinal split, positive Feulgen stainability, presence of constrictions etc., and (2) whether there is a correspondance between the presumed isolated chromosomes and the mitotic chromosomes as to shape, breadth and length relations in animal species differing widely in karyotype.

Material and methods.

The species chosen from this point of view, and their chromosome characters as seen in diploid plates, are the following ones. The data on chromosomes have been cited from MATTHEY (1949).

Fishes: *Salmo fario*, $2n=80$ (PROKOFJEVA), chromosomes slender and of different length, all telomitic.

Cyprinus carpio, $2n=104$ (MAKINO), chromosomes short and thick, of uniform length, all telomitic.

Carassius auratus, $2n=94$ (MAKINO), chromosomes similar to those of the carp, less uniform in length, all telomitic.

Amphibians: *Ambystoma tigrinum*, $2n=26$ (WICKBOM), chromosomes widely different in length, the ratio between shortest and longest pairs being nearly 1/6, some with one, others with two arms (V-shaped).

Reptiles: *Lacerta muralis*, $2n=38$ (MATTHEY), V-shaped chromosomes prevailing (only 2 out of 38 are telomitic and short).

Emys europaea, $2n=50$ (MATTHEY), one-armed chromosomes prevailing (only 4 out of 50 are V-shaped).

Birds: *Gallus domesticus*, $2n=78$ (YAMASHINA), chromosomes of very different size (macro- and microchromosomes, 12 pairs V-shaped with arms of equal or unequal length).

Columba livia, $2n=80$ (YAMASHINA), chromosomes similar to those of the chicken.

Four parts of blood were taken from the big vessels with a syringe containing one part of 2.3% potassium oxalate. The mixture was put immediately in a shaker at 0—1° C to prevent coagulation. For microscopical control a few drops were stained with aceto-carmine. The blood was then transferred into a small Waring blender of molybdenum steel kept in a refrigerator. Isolation of the filaments was performed following the techniques worked out by CLAUDE and POTTER and by MIRSKY. Instead of quartz sand (CLAUDE and POTTER) we used also diatomaceous earth as grinding material. All methods gave the same results, the major part of the observations has, however, been made on material prepared according to MIRSKY's technique.

During the preparation of the material the temperature was kept constant at 0—1° C and the p_{H} at 6.2 by means of a Sörensen puffer solution.

For microscopic examinations a suspension of a few drops of the centrifugate in 0.14 N NaCl was mounted on a slide and stored at 4° C. Observations were made with an ordinary as well as a phase-contrast microscope after toluidine blue and Feulgen staining. Measurements of filaments were made on drawings using a curvimeter on approximately 300 filaments. The drawings were made with a camera lucida at a magnification of 4000.

Observations.

1. Shape and structure of the filaments.

The general aspect of the isolated filaments is that of rigid bodies with only slight sinuosities. Under the phase-contrast microscope one can distinguish V-shaped and rod-shaped filaments. The former ones (Fig. 1a) are typical for such species where some of the mitotic chromosomes are mediocentric (*Amblystoma*, *Emys*, *Lacerta*, *Gallus*, *Columba*). Rod-shaped filaments appear, without exception, in *Salmo* and *Cyprinus* (Fig. 1c, d) where all the mitotic chromosomes are telomitic. In *Carassius* some two-armed filaments are also present (Fig. 1b).

In breadth filaments show little variation within a species, but differ from species to species. The trout has very thin threads in accordance with the mitotic chromosomes which are also slender. The major threads of the fowl and the pigeon, as well as all threads of *Amblystoma*, are remarkably thick.

The stainability with the Feulgen reaction and with toluidine blue is always strong.

When orientation is favourable, both unstained and stained filaments show a clear longitudinal split (Fig. 1e, f, h). Many threads are characterized by a constriction located at the junction of the arms (Fig. 1g) so that telomitic and atelomitic elements can be distinguished.

Among the filaments some forms appear which could be artifacts. Sometimes exceedingly long bodies can be observed which probably are end-to-end unions of several filaments. It is not excluded that such aggregations occur *in vivo*. More probably an artefact is the longitudinal and parallel association of threads of similar length whereby

bundles are formed simulating polytene threads. Finally giant elongated chromatin masses occur which have their origin in the stretching of

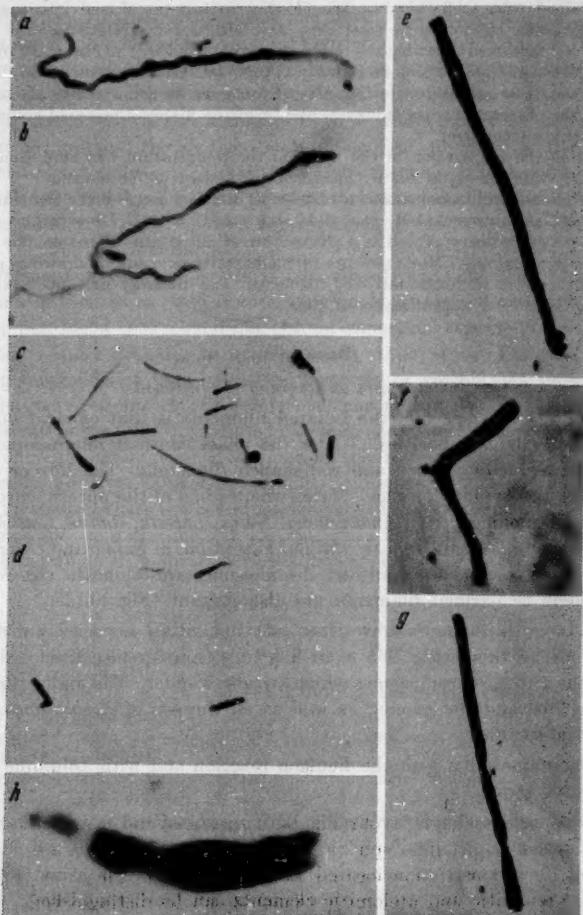


Fig. 1 a-h. Photomicrographs of isolated chromosomes. a, e-g *Ambystoma*, b *Carassius*, c *Salmo*, d *Cyprinus*, h *Gallus*. a-d, h, toluidine blue, e-g phase-contrast.

a, c, d, ca. 1800 \times , e-g ca. 2000 \times , b, h ca. 3600 \times .

entire nuclei. They are always easily distinguishable from isolated threads and are more frequent after low speed operating.

2. Length distribution in different species.

Of each species 300 filaments have been measured as indicated above and the length values grouped into classes of 1, 2, 3 ... units (1 unit corresponding to $2.5\mu = 1$ cm in the drawing). The resulting distributions are represented as histograms in Fig. 2. From them it is immediately obvious that (1) class 2 is the largest in every case showing that the most frequent length of filaments in erythrocytes is the same in all species investigated, and that (2) the range of length varies considerably from species to species. The ratios between highest and lowest classes are small in *Cyprinus*, 4:1, intermediate in *Carassius*, 9:1, *Salmo*, 8:1, *Lacerta*, 7:1, *Emys*, 8:1, *Gallus*, 8:1, *Columba*, 9:1, and highest in *Amblystoma*, 32:1. The distributions in the carp and in the axolotl represent opposite extremes and correspond in this respect remarkably well with the length relations in the metaphase chromosome sets.

The ratio of 8:1 and 9:1 in the studied birds, and that of 32:1 in the axolotl is remarkable, because the mitotic chromosomes show a stronger length differentiation in the birds than in the axolotl. It is difficult to find an explanation: it is possible that the smallest microchromosomes of the birds are lost or clump together during the isolation.

For the intermediate group of species it remained to be tested whether or not the frequencies of the different length classes are different in spite of the nearly identical range of distribution. Two species, the lizard and the pigeon, have been chosen for a statistical test, using the χ^2 -method according to MATHER (1946)¹. The results are summarized in Table 1, from which it is evident that the distributions in both species differ significantly.

Table 1.

Class of length	Number of filaments		Totals	Differences	Squares of differences	χ^2
	<i>Columba</i>	<i>Lacerta</i>				
1	12	29	41	-17	289	7.0487
2	89	128	217	-39	1521	7.0092
3	93	88	181	+ 5	25	0.1381
4	66	43	109	+ 23	529	4.8532
5	28	7	35	+ 21	441	12.6000
6-10	12	5	17	+ 7	49	2.8824
Totals	300	300	600			34.5316

$$\chi^2 = 34.5316; \nu = 5; P < 10^{-4}.$$

$$^1 2XY = \sum_{i=1}^n \frac{(a_{1i} - b \times a_{2i})^2}{b \times (a_{1i} + a_{2i})}$$

where: a_{1i} and a_{2i} frequencies of the 1st and of the 2nd column; b ratio between the total of the frequencies of the 1st and the total of the frequencies of the 2nd column; n number of the classes of the distribution.

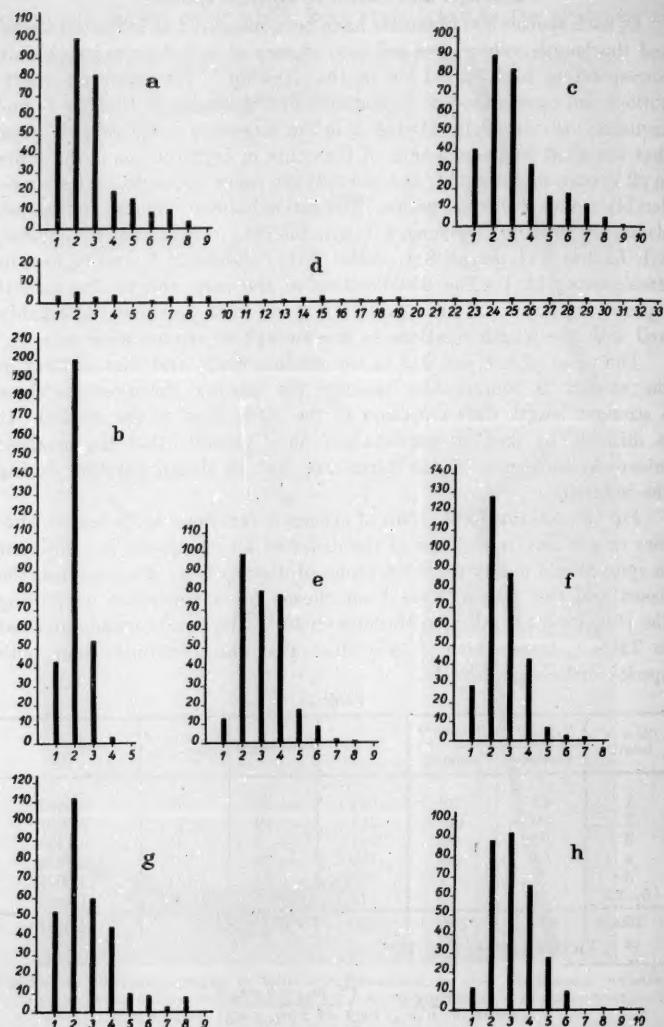


Fig. 2a-h. Distribution of lengths of isolated chromosome. On abscissae: length on drawing in cm, on ordinates: frequency. N = 300 chromosomes in each species. a *Salmo fario*, b *Cyprinus carpio*, c *Carassius auratus*, d *Ambystoma tigrinum*, e *Emys europea*, f *Lacerta muralis*, g *Gallus domesticus*, h *Columba livia*.

The only species in which the correspondance between chromatic filaments and metaphase chromosomes is not so close, is *Carassius auratus*, whose metaphase chromosomes are fairly homogeneous in length (though not so strikingly as in the carp), but whose filaments show a somewhat higher degree of heterogeneity.

A final comparison, if only of orientative significance, can be made by comparing the percentages of major elements both among the filaments and in the metaphase groups. By convention I have considered as major filaments those above class 4, and as major mitotic chromosomes the macrochromosomes of the birds and the longest pairs, both atelomitic and telomitic, of the other species, using the data compiled by MATTHEY (1949). The comparison (Table 2) shows a close resemblance between both series of values. Only for *Carassius* it was not possible to obtain a satisfactory value of the percentage of major mitotic chromosomes, because they were not measurable unambiguously on the published drawings of MAKINO.

Discussion.

In order to decide whether the bodies hitherto called "chromatic filaments" or "threads" can be identified with chromosomes, my own observations and those of previous workers must be compared with regard to the main criteria on which the definition of chromosomes is based.

a) The presence of chromatids was affirmed by MIRSKY, but denied by LAMB. My observations demonstrate that the double stranded structure is present in all species studied, although it is not always easy to prove that the longitudinal split is visible also in unfixed and unstained material.

b) Telomitic and atelomitic chromosomes. In *Cyprinus* where the chromosomes are probably telomitic — since they are very short rods at metaphase — the isolated filaments appear as telomitic or are provided with a very short second arm only. In species where V-shaped chromosomes are present, filaments of the same shape have been found.

c) The presence of a constriction can be demonstrated in some cases, also in unfixed and unstained material, under the phase-contrast microscope. Constrictions separate arms of equal or unequal length. An association of a constriction with the nucleolus, as reported by RIS and MIRSKY, has not been seen.

Table 2.

Species ¹	Major filaments %	Major metaphase chromosomes %
<i>Salmo</i> . . .	13.0	20.0
<i>Cyprinus</i> . . .	0	0
<i>Lacerta</i> . . .	4.0	5.2
<i>Emys</i> . . .	10.0	8.0
<i>Gallus</i> . . .	9.6	15.0
<i>Columba</i> . . .	13.3	10.0

¹The data for *Carassius* and *Amblystoma* are not included, because the material was insufficient (*Amblystoma*) or metaphase measurements unreliable.

d) Positive Feulgen staining has been stated by CLAUDE and POTTER, and by MIRSKY and RIS. YASUZUMI, however, claimed that the positive reaction was limited to small bodies terminally attached to the Feulgen-negative filaments. In my preparations, the Schiff reaction was always positive along the whole length of the threads.

On the basis of this combined evidence, in agreement with MIRSKY, CLAUDE, RIS and MIRSKY, PFEIFFER, and, partly, YASUZUMI, I conclude that the chromatic bodies obtained from resting blood cell nuclei are true chromosomes.

It is another question to decide whether the filaments obtained are entire chromosomes or fragments caused by breakage during the treatment. This point is of prime importance for future investigations. Definite evidence can be gained only from measurements such as have been made in the present study. From the good agreement between interphasic and metaphasic chromosome lengths the conclusion seems warranted that as a rule the chromosomes are unbroken. One cannot exclude on the other hand that fragments and fusions occur occasionally. In general, the distinction between chromosomes and artifacts is easy.

Two points remain to be briefly discussed. The first concerns the relationship between the microscopical structure of squashed nuclei and the isolated chromosomes. TAMINI has pointed out in erythrocyte nuclei of several vertebrates the presence of chromatic filaments and of masses described as chromocenters. Since from broken nuclei of the same type of cells no chromocenters, i. e. fused pieces of chromatin from different chromosomes have been obtained, the bodies observed by TAMINI might be interpreted as close associations of parts of chromosomes, associations which are easily disrupted, as it occurs in some Diptera.

The second point concerns the relationship between the structure of mitotic and of isolated chromosomes (or metabolic chromosomes, as YASUZUMI calls them). Except for the polytenes salivary gland chromosomes of Diptera, the contracted chromosomes of Rhynchota and other insects and Crustacea, it has generally been thought that the interphasic chromosomes are represented by the very thin, unspiralized chromonemata, and that they do not resemble the mitotic chromosomes in shape and structure. Now the demonstration of the preservation of many characters of mitotic chromosomes during the resting stage (split, constrictions, rigidity of the arms) tends to efface this assumed structural difference. Of particular interest in this regard is the presence, during the resting stage, of spiralization and packing, as demonstrated directly by YASUZUMI et al., and indirectly by the close resemblance in form of interphasic and metaphasic chromosomes, as has been pointed out in the present study.

Summary.

1. A comparison has been made between the chromatic threads isolated from erythrocyte nuclei and chromosomes of diploid metaphase plates of several vertebrates. A close resemblance in morphological and structural features was found. It is therefore concluded that isolated filaments are true resting stage chromosomes.

2. Measurements showed all species to possess rather similar ranges of length of isolated chromosomes, but different species differ characteristically in the frequencies of the different length groups. The mitotic chromosomes, measured on published drawings, correspond closely in length with the isolated chromosomes within a species and show the same interspecific differences.

References.

CALVET, F., B. SIEGEL and K. STERN: Electron optical observations on chromosome structure in resting cells. *Nature (Lond.)* **162**, 305—306 (1948). — CLAUDE, A.: Studies on cell; morphology, chemical constitution and distribution of biochemical functions. *Harvey Lect.*, ser. 43°, **1947/48**, 121—164. — HOVANITZ, W.: An electron microscope study of isolated chromosomes. *Genetics* **32**, 500—504 (1947). — HOVANITZ, W., A. R. T. DENUES and R. M. STURROCK: The internal structure of isolated chromosomes. *Wasman Collector* **7**, 233—242 (1949). — LAMB, W. G. P.: The isolation of threads from interphase nuclei. *Exper. Cell. Res.* **1**, 571—581 (1950). — MATHER, K.: Statistical analysis in biology. London: Methuen & Co. Ltd. 1942. — MATTHEY, R.: Les chromosomes des vertébrés. Lausanne 1949. — MIRSKY, A. E., and A. W. POLLISTER: Fibrous nucleoproteins of chromatin. *Biol. Symposia* **10**, 247—260 (1943). — The nucleoprotamine of trout sperm. *J. Gen. Physiol.* **30**, 101—116 (1946). — Chromosin a desoxyribose nucleoprotein complex on the cell nucleus. *J. Gen. Physiol.* **30**, 117—148 (1946). — MIRSKY, A. E., and H. RIS: Isolated chromosomes. *J. Gen. Physiol.* **31**, 1—6 (1947). — The chemical composition of isolated chromosomes. *J. Gen. Physiol.* **31**, 7—18 (1947). — PFEIFFER, H. H.: Experiments with chromosomes isolated from intermitotic nuclei. *Experientia* **6**, 334—335 (1950). — POLLI, E. E.: The behaviour of chromatin in normal and pathological human blood cells. *Exper. Cell. Res.* **1**, 460—472 (1950). — Human isolated chromosomes. Normal and pathological chromosomes of leucocytes. *Experientia* **7**, 138—142 (1951). — RIS, H., and A. E. MIRSKY: Isolated chromosomes. *Exper. Cell. Res.* **2**, 263—267 (1951). — TAMINI, E.: Analisi comparativa della struttura dei nuclei degli eritrociti in alcuni Vertebrati. *Natura (Milano)* **35**, 99—107 (1944). — YASUZUMI, G.: The microstructure of chromatin threads in the metabolic stage of the nucleus. *Chromosoma* **4**, 221—231 (1951). — YASUZUMI, G., G. MIYAO, Y. YAMAMOTO and J. YOKOYAMA: The microstructure and origin of the threadlike bodies isolated from the metabolic nucleus. *Chromosoma* **4**, 359—368 (1951).

Dz. E. E. POLLI, Istituto di Genetica, Milano (Italia), Via Celoria 10.

Aus dem Max Planck-Institut für Meeresbiologie in Wilhelmshaven.

DIE POLYTÄNIE DER RIESENCHROMOSOMEN.

Von

HANS BAUER und WOLFGANG BEERMANN.

Mit 9 Textabbildungen.

(Eingegangen am 5. März 1952.)

Einleitung.

Über den Aufbau der Riesenchromosomen herrschen immer noch Meinungsverschiedenheiten. Die verbreitetste Ansicht, die Polytäniehypothese, besagt, daß diese Chromosomen Bündel von Fibrillen seien, die durch Streckung der spiralisierteren Mitosechromosomen, succedane Zweiteilung ihrer Längselemente und Zusammenbleiben der Teile abkömmlinge entstünden. Die Längsdifferenzierung in färbbare und nichtfärbbare Abschnitte, das Scheibenmuster, kommt nach dieser Hypothese dadurch zustande, daß chromomerenartige Differenzierungen der einzelnen Längselemente infolge der exakten Bündelung auf gleicher Höhe des Chromosoms liegen und so die Querscheiben bilden.

Als Beweise für diese Hypothese gelten in erster Linie die direkten Beobachtungen des fibrillär zusammengesetzten Baues der Riesenchromosomen. Besonderes Gewicht wurde dabei solchen Fällen beigelegt, wo bei der Präparation das Bündel auseinandergespreizt war und in dem aufgeteilten Bereich gleichartige Chromomerenanordnung in seinen Fibrillenteilbündeln zeigte (BAUER 1936).

Gegen diese Befunde hat in erster Linie METZ (zuletzt 1941) eingewandt, daß sie sich auf Artefakte beziegen. Es war also erwünscht, eine Aufspaltung des Fibrillenbündels unter Bedingungen nachzuweisen, bei denen der Artefakteinwand ausgeschlossen werden kann. Über solche Beobachtungen wird hier berichtet. Sie stimmen in ihrem Ergebnis mit neueren Befunden anderer Art über einen fibrillären Aufbau der Riesenchromosomen überein, auf die unten eingegangen werden soll. Von dieser Grundlage aus sollen die abweichenden Hypothesen kritisch gesichtet werden.

Die dieser Mitteilung zugrunde liegenden Beobachtungen wurden von dem einen von uns (H. B.) während eines Aufenthalts in Stockholm gemacht. Herrn Prof. T. CASPERSSON und seinen Mitarbeitern sei auch hier aufrichtig für die erwiesene herzliche Gastfreundschaft gedankt. Ergänzt und erweitert wurden die Beobachtungen am hiesigen Institut im Zusammenhang mit einer eingehenden Untersuchung über Entwicklung und Bau der Riesenchromosomen durch den anderen von uns (W. B.).

Material und Methoden.

Die hauptsächlich verwendete Art ist *Chironomus (Campiochironomus) tentans* FABR.; daneben wurde *C. pallidivittatus* MALLOCH für Kreuzung mit *C. tentans* herangezogen. Beide Arten sind, als Ausnahmen unter den Chironomiden, stenogam. Kopulation und Eiablage erfolgen in kleinsten Gefäßen. Die Larven wurden bei Fütterung mit vorjährigem zerriebem Erlenfallaub aufgezogen.

Untersucht wurden nur die Speicheldrüsen. Ihre mikrotechnische Behandlung war die übliche: kurze Fixierung in Alkohol-Eisessig, Färbung in Karminessigsäure, Untersuchung der von der Sekretmasse isolierten Zellen im Frischpräparat oder nach Montierung in Euparal. Die Photographien wurden im sichtbaren Licht (Blau- oder Grünfilter), einige auch in UV-Licht (275 m μ) aufgenommen.

Beobachtungen.

Chironomus tentans hat bereits für einige frühere Untersuchungen als Material gedient. BUCK und MELLAND haben die Speicheldrüsenchromosomen zu röntgenspektrographischen Versuchen herangezogen, ohne die Morphologie näher zu behandeln. MELLAND hat in der Zusammenfassung ihrer vergleichend-entwicklungsgeschichtlichen Untersuchungen diese Art angeführt, ohne mehr als schematische Abbildungen der Drüsenzellen zu geben. BAUER (1945) hat in einer allgemeineren Darstellung die Art kurz berücksichtigt und einen überlebenden Zellkern abgebildet. Nach ihm besitzt die Art wie die Mehrzahl der Chironomiden haploid 4 Chromosomen, doch unterscheidet sie sich von den cytologisch bekannten Arten der Untergattung *Chironomus* dadurch, daß nicht das kurze 4. Chromosom Träger des Nukleolus ist, sondern daß an 2 oder 3 langen Chromosomen je ein Nukleolus gebildet wird. Bei der nächstverwandten Art *C. pallidivittatus*, dem einzigen anderen europäischen Vertreter der Untergattung *Campiochironomus*, ist dagegen nur 1 Nukleolus an einem der langen Chromosomen vorhanden (BAUER 1936; für die dort als *Chironomus* spec. I bezeichnete Art gab BAUER 1937 den richtigen Namen *pallidivittatus* an).

Das 4. Chromosom von *C. tentans* (ebenso wie das von *C. pallidivittatus*) ist verhältnismäßig lang (Abb. 1) und weist normalen Querscheibenbau auf, der nur an 3 Stellen nicht deutlich ist, an denen das Chromosom aufgelockert ist. Die 1. und die 3. Auflockerungszone sitzen nahe den beiden Enden des Chromosoms; die 2., nahe der 1. gelegene, ist im Freilandmaterial stets als deutlicher Ringwulst ausgebildet und stellt eine Struktur dar, die schon bei anderen Arten als Balbiani-Ring beschrieben worden ist, z. B. bei *C. Thummi* (vgl. BAUER 1935). Bei *C. tentans* ist dieser Balbiani-Ring erheblich größer als bei den bisher untersuchten Arten; ein kurzes Chromosom mit einem ähnlich großen Ring bildet nur MELLAND von einer unbestimmten *Chironomus*-Art ab, ohne ihn näher zu besprechen.

Außer in seiner normalen Stäbchenform tritt das 4. Chromosom von *C. tentans* in natürlichen Populationen noch in einer eigenartigen Ring-

form auf, bei der nur 2 freie haploide Enden vorhanden sind (Abb. 2 und 3). In Abb. 2 ist das eine der Enden verdeckt; Abb. 3 gibt ein Chromosomenpaar wieder, das nur sehr lose gepaart ist. In diesen ringförmigen Chromosomen sind die Auflockerungszonen in derselben Weise ausgebildet, wie im stabförmigen Chromosom; die ebenfalls als Balbiani-Ring ausgebildete 2. Zone ist meistens nicht allseitig gleichmäßig als Wulst vorhanden, sondern vorwiegend oder ganz auf die konvexe Seite des Chromosomenringes verlagert.

Die Deutung dieser Ringform des Chromosoms hat Schwierigkeiten bereitet. Auf Grund der Lebenduntersuchung eines beschränkten Aus-



Abb. 1. *Chironomus tentans*. Normales 4. Chromosom mit den 3 Auflockerungszonen B_1 — B_3 , die 2. als typischer Balbiani-Ring ausgebildet. Karminessigsäure, Euparal. Etwa 1200mal.

gangsmaterials hat BAUER (1945) sie zunächst als heterozygote Inversion bezeichnet. Bei einer solchen sollten aber 4 haploide oder 2 diploide Enden vorhanden sein, die sich bei der späteren Untersuchung nie haben nachweisen lassen. Permanenter Verlust zweier freier Enden kann dadurch entstehen, daß sich die homologen Chromosomen terminal vereinigen, wie es im Endeffekt die attached-X-Stämme von *Drosophila* zeigen. Um die besondere Ringform bei *C. tentans* zu ergeben, müßte eine Tandemvereinigung vorliegen, bei der sich die Chromosomen hintereinander mit den nicht homologen Enden vereinigt haben. Solche strukturelle Tandemvereinigungen führen aber natürlich zu Störungen im Erbgang (mono- und trisome Zygoten), die in der Population zu schneller Ausmerze derartiger Chromosomenmutationen führen müssen. Die andere Deutungsmöglichkeit für den permanenten Verlust zweier freier Enden ist die, daß der eine Partner als Ringchromosom vorliegt, wie es BAUER (BAUER und CASPERSSON 1949) dann auch annahm. Die durch Ringchromosomen bedingten mitose- und meiosemechanischen Störungen, wie auch der ständige Verlust in der Population durch Ausfall der wegen der terminalen Deletionen wohl sicher letalen homozygoten

Ringchromosomeukombination hätten nicht unbedingt gegen das tatsächliche Vorliegen eines Ringchromosoms gesprochen, weil sie durch Heterosis der Heterozygoten ausgeglichen werden könnten. Durch die direkte morphologische Analyse ließ sich die Annahme der Ringform des einen Partnerchromosoms aber weder beweisen noch widerlegen. Selbst für so lose gepaarte Chromosomen, wie sie Abb. 3 wiedergibt,

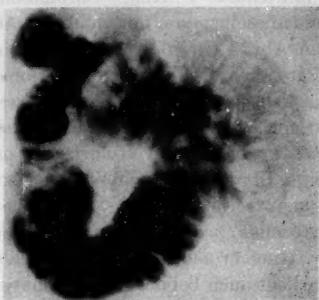


Abb. 2.

Abb. 2. *Chironomus tentans*. Inversions-heterozygotes 4. Chromosom. B_1-B_4 die Auflockerungszonen, B_5 der exzentrische Balbiani-Ring. Lanthanazetat, UV-Aufnahme bei 275 m μ . Etwa 1200mal.

Abb. 3. *Chironomus tentans*. Inversions-heterozygotes 4. Chromosom mit nur loser Paarung der Homologen. Der Pfeil zeigt die Terminalpaarungsstelle an. Karmin-essigsäure, Euparal. Etwa 1200mal.

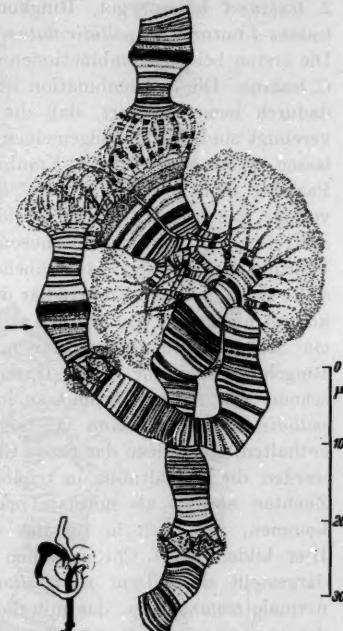


Abb. 3.

ist eine Aussage nicht möglich, weil die Kontinuität der Chromosomen im Balbiani-Ring scheinbar unterbrochen ist und die Zusammengehörigkeit der Partnerabschnitte rechts und links von dem Balbiani-Ring nicht sichergestellt werden kann. Eindeutig widerlegt wurde die Ringchromosomendeutung dann aber durch die Untersuchung der Paarungskonfigurationen in Bastarden von *C. pallidivittatus* und *C. tentans*.

Es gelang in seltenen Fällen, die Arten in beiden Richtungen zu paaren (BEERMANN, unveröffentlicht) und eine geringe Anzahl — meist nur einzelne Larven aus dem etwa 1000 Eier enthaltenden Gelege — von F_1 -Bastarden aufzuziehen. Diese Bastarde sind sehr vital und in

beiden Geschlechtern hochgradig fertil, so daß F_2 - und Rückkreuzungstiere reichlich zur Verfügung standen. In einer Rückkreuzungszucht aus einem Bastard-♀ und einem *tentans*-♂, bei der das ♀ normale 4. Chromosom in Stäbchenform von beiden Eltern her erhalten hatte und das ♂ ein normales und ein „Ring“-Chromosom enthielt, sollten die folgenden 4 Kombinationen auftreten: 1. *tentans*-4 normal homozygot; 2. *tentans*-4 heterozygot, Ringkonfiguration; 3. *pallidivittatus*-4 mit *tentans*-4 normal; 4. *pallidivittatus*-4 mit *tentans*-4 „Ring“-Chromosom. Die ersten beiden Kombinationen sind dieselben wie innerhalb der Art *C. tentans*. Die 3. Kombination ist in Abb. 4a wiedergegeben. Sie ist dadurch bemerkenswert, daß die Partnerchromosomen nur terminal vereinigt sind und im allgemeinen jegliche laterale Paarung vermissen lassen. Wenn also in der 4. Kombination in gleicher Weise die laterale Paarung fehlt und wenn bei *C. tentans* wirklich ein Ringchromosom vorläge, so sollten entweder die beiden 4. Chromosomen völlig ungepaart auftreten, weil das Ringchromosom kein freies Ende für die terminale Paarung besitzt oder das stäbchenförmige *pallidivittatus*-Chromosom sollte sich mit einem Ende radiär dem Ringchromosom ansetzen. Beides kommt nicht vor. Wie Abb. 4b zeigt, liegt auch bei der 4. Kombination ein Stäbchenchromosomenpaar in terminaler Vereinigung, also kein Ringchromosom vor. Zum Unterschied von der 3. Kombination (a) scheint das *tentans*-Chromosom in umgekehrter Anordnung mit dem *pallidivittatus*-Chromosom vereinigt zu sein, also eine Inversion zu enthalten, die nahezu das ganze Chromosom umfaßt. Vollständig klar werden die Verhältnisse in triploiden Individuen, die in Bastard- F_2 -Zuchten sowohl als normale männliche wie weibliche Larven vorkommen, wie auch in für das 4. Chromosom trisomen Individuen. Hier bilden die 4. Chromosomen Dreiergruppen, wie sie in Abb. 4c dargestellt sind. Dem *pallidivittatus*-Chromosom sitzt terminal das normale *tentans*-4 an, das mit dem anderen 4. *tentans*-Chromosom in dessen ganzem invertiertem Bereich lateral gepaart ist. Die Inversionsbrüche sind ganz dicht am linken und nahe dem rechten Ende erfolgt. Die Ringkonfiguration bei *C. tentans* kommt also dadurch zustande, daß primär die sehr feste terminale Vereinigung vorgenommen wird, die so eng ist, daß keinerlei Grenze zwischen den beiden Partnern zu erkennen ist. Durch die laterale Paarung der Inversionsbereiche legt sich das Chromosom dann zu der Ringform mit 2 haploiden Enden zusammen.

In Laborzuchten von *C. tentans* wurden dann auch die Inversionschromosomen homozygot gefunden. Diese waren in dem schwedischen Freilandmaterial nicht vorhanden gewesen, ließen sich aber in dem umfangreicherem Plöner Material auch nachweisen. Bei diesen Homozygoten macht sich die gleiche terminale Paarung des einen Endes bemerkbar

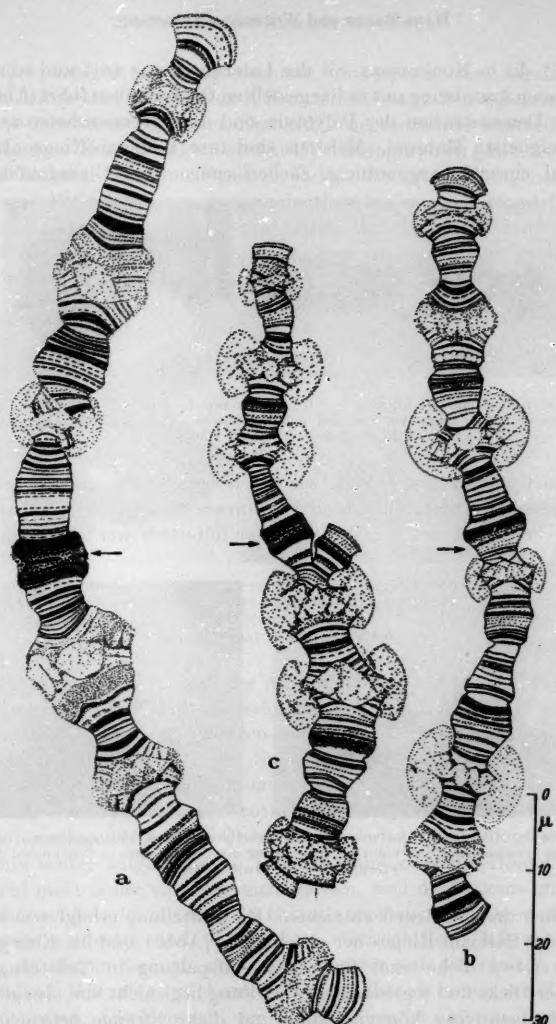


Abb. 4a—c. 4. Chromosomen aus Kreuzungen zwischen *Chironomus tentans* und *C. pallidivittatus*. a F₁-Rückkreuzungsindividuum, terminale Paarung des normalen *tentans*- mit dem *pallidivittatus*-Chromosom; b F₁-Rückkreuzungsindividuum, terminale Paarung des invertierten *tentans*- mit dem *pallidivittatus*-Chromosom; c triploides F₁-Individuum. Das normale *tentans*-Chromosom ist mit dem invertierten im Inversionsbereich lateral, mit dem *pallidivittatus*-Chromosom terminal gepaart. In allen Bildern liegen die *tentans*-Chromosomen unten. Die Pfeile bezeichnen die Terminalpaarungsstellen.
Karminessigsäure, Euparal. Etwa 1200mal.

(Abb. 5), die in Konkurrenz mit der Lateralpaarung tritt und so zu der besonderen Anordnung mit radiär gestellten Querscheiben führt (Abb. 5b).

Zur Demonstration der Polytanie sind die Inversionsheterozygoten das geeignete Material. Meistens sind ihre Balbiani-Ringe als vorwiegend einseitig angeordnete, fächerförmige Körper ausgebildet, in

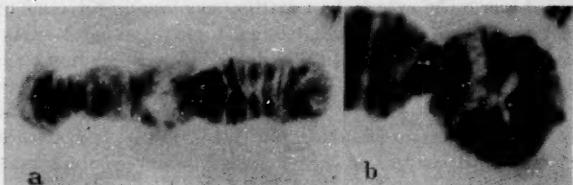


Abb. 5a u. b. *Chironomus tentans*. 4. Chromosom mit homozygoter Inversion. a total; b Endabschnitt. Terminaler Paarung neben lateraler. Karminessigsäure, Euparal.
a Etwa 750mal; b etwa 1600mal.

denen sich gut übersehen läßt, wie das Riesenchromosom seinen festen Zusammenhalt aufgibt und sich in dünne Stränge aufteilt (Abb. 6), die zur Peripherie des Ringes hin weiter unterteilt werden, bis sie sich

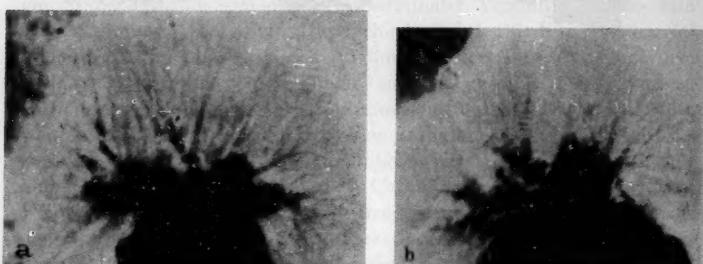


Abb. 6a u. b. *Chironomus tentans*. Inversionsheterozygote 4. Chromosomen. Balbiani-Ringe aus verschiedenen Individuen. Aufspaltung des Chromosoms in zunehmend dünne Fibrillenbündel. Etwa 1800mal.

schließlich dem Nachweis entziehen. Die Aufteilung erfolgt von beiden Seiten des Balbiani-Ringes her gleichmäßig (Abb. 1 und 3). Eine gesetzmäßige (etwa dichotome) Folge der Aufspaltung in Teilstränge bestimmter Dicke und regelmäßiger Abstufung liegt nicht vor. Im gleichen Querscheibenniveau können dünne und dicke Stränge nebeneinander liegen, wie die Beispiele der Abb. 6 zeigen.

Die Balbiani-Ringe sind an ihrer Struktur ohne weiteres von Nukleolen zu unterscheiden. Die Nukleolen bestehen aus einer homogenen oder vakuolisierten Substanz, die gegen den Kernsaft durch eine scharfe Kontur begrenzt ist; sie werden nur in ihrem zentralen Teile von dem

mehr oder weniger weit aufgelockerten Chromosom durchzogen. Die Balbiani-Ringe sind in lebenden Zellen weniger stark lichtbrechend, optisch nur undeutlich gegen den Kernsaft abgegrenzt und besitzen keine glatte Kontur. Besonders klar wird in UV-Photographien (Abb. 2 und 7), daß der Balbiani-Ring von Büscheln fädiger Strukturen aufgebaut ist, die bis zur Peripherie verlaufen, undeutlich begrenzt sind und flockig erscheinen. Dieses Aussehen kommt daher, daß die in sehr feine Komponenten aufgespaltenen Chromosomen von einer an ihnen gebildeten oder kondensierten Substanz umhüllt sind.



Abb. 7 a u. b. *Chironomus tentans*. a Inversionsheterozygot 4. Chromosom mit stark ausgebildetem Balbiani-Ring; b Ausschnitt aus diesem (in etwas anderer Einstellung) etwas nach rechts gedreht. Lanthanazetat, Karminessigsäure, UV-Aufnahme bei 275 m μ .

a Etwa 900mal; b etwa 2700mal.

Unabhängig von dem Grad der Aufteilung des Chromosoms behalten die Teilstränge die charakteristische Gliederung in Querscheiben und Zwischenscheiben bei. Die letzteren sind als solche allerdings nicht sichtbar, weil sie sich nicht von der Substanz im Balbiani-Ring abheben. Abb. 8 und 9 geben Aufnahmen eines Balbiani-Ringes in verschiedener Einstellung wieder, aus denen deutlich wird, daß in den dickeren Teilbündeln homologe Folgen von Querscheiben vorliegen. Bei den zur Peripherie hin weiter aufgespaltenen Bündeln kann zwar die Homologisierung nicht mehr sicher vorgenommen werden, weil die Dicken- und Abstandsunterschiede der nur noch als Granula erscheinenden Querscheiben nicht mehr eindeutig sind, doch ist es offensichtlich, daß auch die feinsten sichtbaren Stränge, deren Durchmesser sich auf etwa $1/4 \mu$ nur noch schätzen läßt, als Körnchenreihen, nicht aber als homogene Stränge vorhanden sind. Die Mehrzahl der Querscheiben ist einfach, ohne Verbindung zu einer Nachbarscheibe. Lediglich im Bereich des ungeteilten Chromosoms oder der dickeren Stränge ist eine kapselartige Vereinigung gelegentlich zu finden.

Die Aufteilung der feinen Stränge ist durch den vergrößerten Ausschnitt in Abb. 9 deutlich gemacht. An den Aufspaltungsstellen spreizen

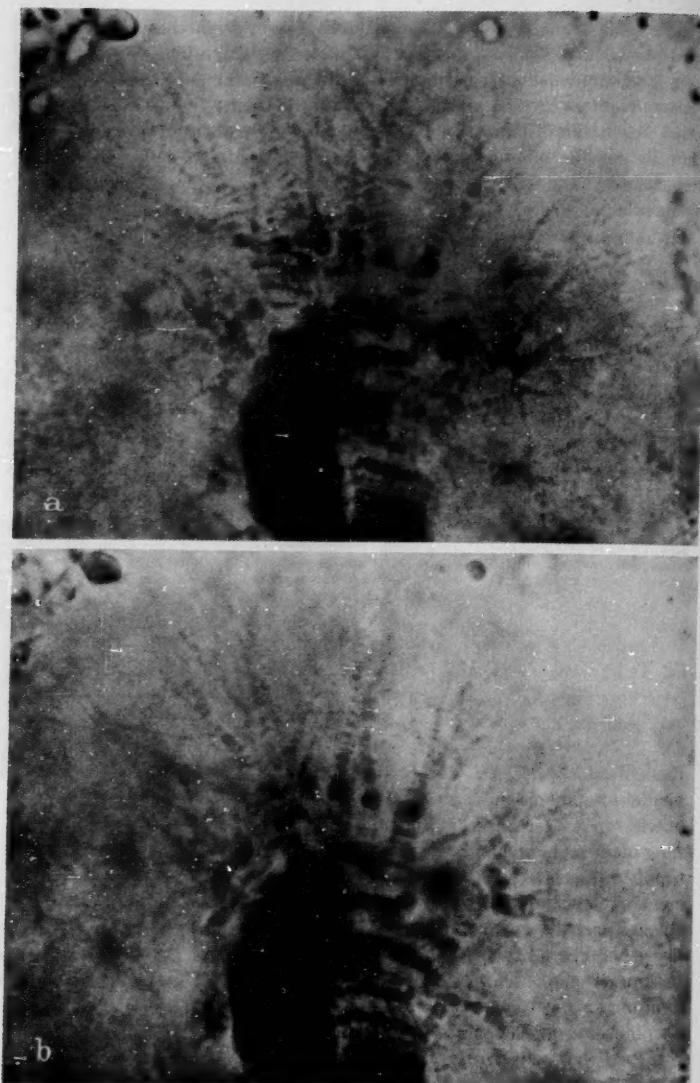


Abb. 8a u. b. *Chironomus tentans*. Balbiani-Ring aus inversionsheterozygotem 4. Chromosom. Aufspaltung des Chromosoms in feinste Teilbündel.; b etwa 3 μ tiefere Einstellung als a. Karminessigäure (Frischpräparat). Etwa 2400mal.

sich die Teilbündel in einem ziemlich weiten Winkel auseinander. Die Anzahl der feinen Teilstränge läßt sich auf einige Hundert schätzen; sie erscheint nicht ausreichend, um vereinigt den ganzen Querschnitt des Chromosoms zu erfüllen. Es ist aber anzunehmen, daß neben den noch als Granulareihen erkennbaren Teilsträngen feiner aufgespaltene Büschel liegen, die optisch nicht mehr auflösbar sind. Man hat gelegentlich den Eindruck einer sehr verschwommenen Querstreifung in Teilen des Balbiani-Ringes, in denen erkennbare Teilstränge nicht vorhanden sind, so als ob submikroskopische Fibrillen gleichmäßig verteilt noch den alten Zusammenhang schwach erkennen ließen. Auch die UV-Bilder (Abb. 2,

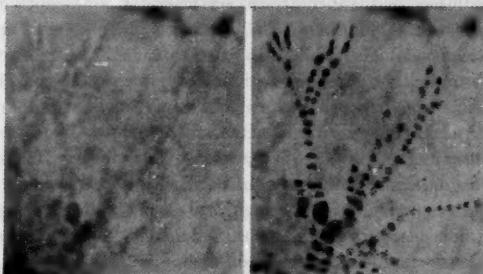


Abb. 9. *Chironomus tentans*. Ausschnitt aus dem Balbiani-Ring der Abb. 8, den rechts gelegenen Teil um etwa 45° nach links gedreht wiedergebend. Etwa $0,5 \mu$ tiefere Einstellung als bei Abb. 8a. Links Photo, rechts dasselbe überzeichnet, um den Verlauf der auffälligeren Teilbündel und ihre Verzweigungen zu verdeutlichen. Etwa 3200mal.

und 7) sprechen für eine gleichmäßige Erfüllung der Ringe mit fibrillären Elementen.

Mit einer Aufteilung in submikroskopische Dimensionen muß auch an der Peripherie des Balbiani-Ringes gerechnet werden, weil es nie gelingt, den kontinuierlichen Verlauf von Teilsträngen durch den Ring hindurch zu verfolgen. Es gibt hierzu allerdings die Alternativerklärungen, daß entweder die Kontinuität des Chromosoms im Ring faktisch unterbrochen ist, oder die Strecke, die die beiden Aufspaltungs-zonen verbindet, keine Querscheiben aufweist, oder daß diese Querscheiben infolge von Nukleinsäureschwund nicht mehr färbbar sind. Keine dieser Alternativdeutungen wird durch zwingende Argumente gestützt. Aber selbst wenn das der Fall wäre, würden die hier behandelten Fragen davon nicht berührt werden; für sie ist entscheidend der direkte Nachweis der Aufspaltung des Chromosoms im sichtbaren Bereich.

Die beschriebene Struktur der Balbiani-Ringe ist keine Besonderheit der beiden untersuchten *Chironomus*-Arten. In gleicher Ausbildung findet man sie bei den verschiedensten Chironomiden dann, wenn die Ringe groß genug sind und keine Heterochromatinzonen einschließen, die durch Anastomosenbildung den regelmäßigeren Aufbau verwischen.

Diskussion.

Die oben dargestellten Befunde vom multiplen Bau der Riesenchromosomen sind ein direkter und unwiderleglicher Beweis für die Polytäniehypothese, aber eigentlich nur noch notwendig gewesen, um auch die Skeptiker zu überzeugen. Die Zustimmung, die die Hypothese seit ihrer ersten und noch unvollkommenen Begründung durch KOLTZOFF (1934) und BRIDGES (1935) gefunden hat, beruht eben darauf, daß sie „vernünftig“ ist und mit wenigen Annahmen die Besonderheiten der Riesenchromosomen auf allgemeine Chromosomeneigenschaften zurückführt.

Die Strukturverhältnisse im Balbiani-Ring machen nur noch deutlicher, was über den Fibrillärbau schon sonst angegeben worden ist (BAUER 1935, 1936, KOLLER 1935, PAINTER und GRIFFEN 1937, u. a.). Auch experimentell sind genügend Stützen für ihn beigebracht worden. Die anisodiametrische Entquellung der Riesenchromosomen läßt sich nur auf der Basis eines Fibrillärbaues erklären (SCHMIDT 1941). Mit dem Mikromanipulator lassen sich Fibrillenteilbündel abheben, die die gleiche Chromomerenfolge behalten wie das übrige Chromosom (D'ANGELO 1946). Durch Röntgenbestrahlung embryonaler Zellen lassen sich Chromosomenmutationen erzeugen, die nur einen Teil des Chromosomenquerschnitts betreffen, der je nach dem Zeitpunkt der Bestrahlung, also dem Grad der Polytänisierung der bestrahlten Zellen verschieden ist. Je später die Bestrahlung erfolgt, um so geringer ist in den erwachsenen Chromosomen der Durchmesser des betroffenen Teilbündels (SLIZYNSKI 1950).

Aus dem Polytänbau wird auch ohne weiteres verständlich, wie der von BAUER (1938a) an Nährzellen von *Musciden* beobachtete Zerfall der Riesenchromosomen in eine Vielzahl kleiner Elemente zustande kommt. Unter Kontraktioen können sich die Längselemente verselbständigen. Ebenso finden die verschiedenen Ausbildungsformen der Chromosomen in den Speicheldrüsen von Cecidomyiden (WHITE 1948) und anderen Nematoceren (MAIN 1949) von der Polytänieauffassung her ihre Erklärung. Die Übergänge zwischen Kernen mit normalen Riesenchromosomen und Kernen von Retikulärbau kommen durch verschiedene weitgehende Lockerung des Fibrillenzusammenhalts zustande. Die Riesenzelle der Speicheldrüse von *Lestodiplosis* mit einer polyploiden Anzahl von Riesenchromosomen (WHITE 1946) ist so entstanden zu denken, daß nach einer ersten Polytänisierung die Chromosomen wie in *Musciden*-nährzellen in ihre Elemente zerfallen sind, die dann eine erneute Phase der Polytänisierung durchgemacht haben.

Der Polytäniehypothese sind von DARLINGTON, KODANI, KOSSWIG und SENGÜN, sowie METZ andere Hypothesen entgegengestellt worden.

KOSSWIG und SENGÜN (1947f.) erkennen zwar einen Fibrillärbau der vollentwickelten Riesenchromosomen an, doch haben sie besondere Vorstellungen über ihre Genese entwickelt, die eine Diskontinuität der

Chromosomenstruktur junger und alter Kerne postuliert. Da ihre Argumente im wesentlichen aus der Entwicklungsgeschichte und dem Vergleich des Chromosomenbaues in verschiedenen Geweben abgeleitet werden, ist hier nicht der Ort, näher auf diese Hypothese einzugehen. Sie ist von BEERMANN (1952a) widerlegt worden.

KODANI und DARLINGTON lehnen die Vermehrung der Längselemente während des Chromosomenwachstums ab. KODANI (1941) hat das Verhalten der Chromosomen von *Drosophila melanogaster* unter dem Einfluß von NaOH-Harnstoffgemischen (vom pH 13—14) untersucht und aus seinen Beobachtungen ein Modell der Chromosomen aufgestellt, das höchst kompliziert ist und sehr merkwürdige Struktureinzelheiten postuliert. Das Wesentliche ist dabei, daß die Chromosomen nur aus den 4 Chromatiden bestehen, mit denen die Zelle ihr Wachstum begann, und daß diese Chromatiden ein ungleiches Dickenwachstum durchgemacht haben, wobei sie in den Zwischenscheiben den vollen Durchmesser des Chromosoms ausfüllen sollen, indem jede Chromatide einen tortenstückförmigen Quadranten bildet, während sie in den Querscheiben dünneren, flachliegende Schlingen bilden, deren Außenseiten zigarren- oder flaschenkorkförmige „bulbs of nucleic acid“ ansitzen. Für die gelegentliche Aufspaltung in Fibrillenteilbündel gibt KODANI nur die Erklärung: „they are merely the groups of the protein micelles which as a whole constitute a single true chromonema.“ KODANI vergleicht sein Modell mit Lampenbürstenchromosomen, dabei im einzelnen die „nucleic acid bulbs“ mit deren seitlichen Fortsätzen, obwohl diese, wie KODANI selbst feststellt, bei den Lampenbürstenchromosomen gerade keine Nukleinsäure enthalten. KODANIS Auffassung steht nun in Widerspruch zu einer anderen Modellvorstellung, an deren Entwicklung auf Grund von Versuchen mit Natronlaugebehandlung allein er ein Jahr vorher (CALVIN, KODANI und GOLDSCHMIDT 1940) beteiligt war. Diese Vorstellung rechnete noch mit einer Vermehrung der Längselemente, wobei aber die neugebildeten peripheren Chromonemen länger als die erhaltenen bleibenden alten Chromonemen sein und sich auf der Höhe der Chromomeren der ursprünglichen Chromonemen in seitliche Schlingen legen sollten, die radiär abstehend sich mit Nukleinsäure inkrustieren und so die Querscheiben ergeben sollten. Die Tatsache, daß durch ganz ähnliche Behandlungen Bilder entstehen, die so verschiedener Interpretation zugänglich sind, genügt wohl, um die Unhaltbarkeit der Modellvorstellungen zu demonstrieren, deren Einzelheiten auch vom chemischen Standpunkt aus unbegründet sind. Mit starker Natronlauge lassen sich die Chromosomen eben nur zerstören, und alles, was aus den mikroskopischen Bildern abgeleitet worden ist, kann nur als Mißdeutung von Artefakten angesehen werden.

DARLINGTON (1949, 1950) erkennt im Gegensatz zu KODANI den multiplen Bau der Riesenchromosomen an, meint aber umgekehrt, daß,

wenn ein Speicheldrüsenchromosom 128 oder 256 Längselemente enthält, die gleiche Anzahl bereits im mitotischen Chromosom vorgelegen hat. "But there is now the possibility that the chromosomes of this nucleus were originally each subdivided 64 or 128 times, being based in fact on that number of polypeptide chains which only become detectable when the whole system comes to be shaken out or blown out with the materials it has been engaged in secreting."¹ Solche Aussagen und weitere wie diese: die Speicheldrüsenchromosomen seien "merely swollen chromosomes bloated with their own products," bleiben natürlich sehr vage ohne konkrete Aussagen darüber, welche strukturchemischen Prozesse eine gleichmäßige „Schwellung“ der einzelnen Polypeptidkette bewirken können; sie schließen im einzelnen auch ein, daß die Desoxyribosenukleinsäure ein „product“ der anschwellenden Polypeptidkette ist. DARLINGTONS Hypothese erwachsen aber sofort unüberwindliche Schwierigkeiten, wenn versucht wird, auf ihrer Grundlage den Zerfall der polytären Chromosomen (Leumzellen der Culiciden nach BERGER 1938 und GRELL 1946; Nährzellen der Musciden) zu erklären. Hier müßte dann postuliert werden, daß entweder die in polyploider Anzahl auftretenden kleinen Chromosomen nur noch aus einer sehr viel kleineren Anzahl von Polypeptidketten bestehen, die, um das tatsächliche Volumen der Chromosomen zu ergeben, weiterhin „swollen and bloated“ bleiben. Damit wären die nach dem Zerfall vorliegenden Chromosomen erheblich verschieden von denen vor Beginn des Wachstums. Oder es muß angenommen werden, daß unmittelbar vor dem Zerfall eine Polypeptidkettenvermehrung erfolgt, wobei aber der Chromosomen-durchmesser nicht zunimmt, die „products“ also im gleichen Maße aufgebraucht werden, wie sich die Ketten vermehren. Wenn auf diese Weise die Annahme einer Vermehrung der Längselemente doch eingeführt wird, ist nicht einzusehen, warum dieses Prinzip nicht unmittelbar für das Wachstum der Chromosomen herangezogen werden kann. Schließlich berücksichtigt DARLINGTON nicht die Kernverhältnisse der Wanzen, deren endomitotisches Wachstum unter regelmäßiger Zweiseitung der Chromosomen vor sich geht. Während für die Anhänger der Polytänie-auffassung der Unterschied zwischen Speicheldrüsenkernen von Wanzen und Dipteren nur darin besteht, daß in einem Falle die Teilungsprodukte gebündelt bleiben, im anderen getrennt werden, muß DARLINGTON entweder einen grundsätzlichen Unterschied zwischen den beiden Kernwachstumsarten annehmen, oder er muß auch für die somatischen Kerne der Heteropteren eine schrittweise Halbierung des Polypeptidkettenbündels fordern, wobei dann die Größengleichheit der Chromosomen in den verschiedenen Teilungsschritten durch eine kompensierende schritt-

¹ Grundsätzlich die gleiche Anschauung hat schon 1936 Prof. C. McCLEUNG dem einen von uns (H. B.) gegenüber mündlich zum Ausdruck gebracht.

weise Verdickung „by their own products“ erfolgen müßte. Diese unwahrscheinlichen Konsequenzen machen DARLINGTONS Anschwellungshypothese unannehmbar. Er hat sie auch nicht aus irgendwelchen Untersuchungen an Riesenchromosomen abgeleitet, sondern sie als Nebenergebnis gewonnen bei der Analyse röntgeninduzierter meiotischer Chromosomenmutationen. Unter diesen fand er solche, die nicht mehr den ganzen Querschnitt einer Chromatide betreffen, also auf einen zusammengesetzten Bau der Chromatiden hinweisen. Und daß er nun gleich den Polypeptidketten als letzten möglichen Struktureinheiten eine so hohe Bedeutung zuweist, ist wohl seiner Abneigung zuzuschreiben, von dem sein ganzes Hypothesengebäude beherrschenden Prinzip von der Chromatide als Verhaltenseinheit der Chromosomen abzugehen und neben diesem eine hierarchische Staffelung morphologischer Unterseinheiten zuzugeben, obwohl zur Erklärung der beobachteten Chromosomenmutationen wohl schon die Annahme einer Gliederung in Halb- oder Viertelchromatiden genügen würde. Für deren Existenz und sogar kinetische Selbständigkeit sind ja (besonders bei Cocciden; vgl. die Zusammenfassung von S. HUGHES-SCHRADER 1949) genügend Beweise vorhanden, während über die Anzahl der Polypeptidketten im Chromosom bisher nichts ausgesagt werden kann, ja, streng genommen, nicht einmal der Beweis dafür erbracht ist, daß Polypeptidketten die Längsstrukturelemente sind. Die Ablehnung von DARLINGTONS Hypothese des Riesenchromosomenwachstums schließt natürlich nicht die Ablehnung der Möglichkeit ein, daß die Mitosechromosomen hochgradig multiple Struktur haben, eine Möglichkeit, deren Konsequenzen schon seit langem (z. B. auf der Klampenborger Konferenz 1938) diskutiert werden. Für die Polytänieauffassung würde sie bedeuten, daß die Anzahl der in den Riesenchromosomen vorhandenen Längselemente nicht gleich der Anzahl der endomitotisch vermehrten Chromosomen, sondern gleich dem Produkt aus dieser Anzahl und der Anzahl der im Mitosechromosom vorliegenden Längselementen ist.

Die Ansichten von METZ in ihrer letzten Formulierung (1941) lassen sich mit der Polytänieauffassung insofern vereinbaren, als er die Annahme einer Vermehrung der Chromonemen während des Kernwachstums zuläßt. Sein hauptsächlicher Einwand gilt den in den ersten Jahren der Riesenchromosomenanalyse gemachten Angaben, daß die mikroskopisch sichtbaren Fibrillen und Granula letzte Strukturelemente und den aus anderen Zellarten beschriebenen Chromosomen gleichzusetzen seien, und besagt, daß das auf Speicheldrüsenchromosomenlänge gestreckte Mitosechromosom bei gleichbleibendem Volumen submikroskopisch dünn werden würde und deshalb niemals als Einzelement sichtbar sein kann. Dieser Folgerung ist aber seit langem von den Anhängern der Polytänieauffassung Rechnung getragen (BAUER 1938 b,

PAINTER 1939), für die die sichtbare Fibrillierung nun die Aufsplitterung des Chromosoms in oligotäne Teilbündel bedeutet. Dem stellt METZ aber seine bekannte Hypothese entgegen, nach der die sichtbare Struktur nicht auf der Fibrillierung beruht, sondern als Epistuktur durch Einlagerung von „achromatic droplets“ in Form eines Wabenwerkes ausgebildet ist. In den Wabenwänden verlaufen zwar als ungeordnetes Netz die Fibrillen (chromonemata), doch sind sie zu plastisch, um gegenüber der Oberflächenspannung der Wabenwände formgebende Eigenschaften zu zeigen. Alle Aussagen über einen sichtbar fibrillären Bau der Riesenchromosomen hält METZ für falsch; sie beruhen nach ihm auf falscher Deutung von aneinandergrenzenden Wabenreihen. Diese Ansicht läßt sich auf die oben beschriebenen Befunde am Balbiani-Ring jedoch nicht ausdehnen. Nun haben bereits POULSON und METZ (1938) Beobachtungen am Balbiani-Ring einer unbestimmten *Chironomus*-Art gemacht, aber anscheinend wirklich klare Bilder nicht erhalten; denn sie schreiben von einem “fine and intricate chromatic network which springs from the chromatic discs and branches out into the surrounding materials.” “The chromatic extensions from the bands, while superficially like a branching system of rootlets, nevertheless form an intricate three-dimensional network, the larger members of which are radially disposed. The bases of these larger members arise from densely staining bands which characterize the region.... The thinner bands on either side of the heavy bands appear not to contribute to the chromatic network.” Diese Ansicht, daß die Fibrillenbündel im Balbiani-Ring *laterale* Auswüchse der normalen Querscheiben sind und keine Aufspaltungsstellen darstellen, hält METZ auch 1941 noch aufrecht: “.... thread-like lines may be seen in this material; but these extend out laterally, fan-like, with many branches, more than they do longitudinally.” Hier kann nur ein Beobachtungsfehler vorliegen, auch trifft die Angabe, daß die Fibrillen im Balbiani-Ring ein Netzwerk bildeten, für das von uns analysierte Material bestimmt nicht zu. Die Wabenbauhypothese kann schließlich nicht die besonderen Strukturverhältnisse in den Chromosomen der Speicheldrüsen jüngerer Larven und der Malpighischen Gefäße erklären (BEERMANN 1952a) und erweist sich auch darin als reine *ad hoc*-Hypothese, die für einen Einzelfall — die ausgewachsenen Speicheldrüsenchromosomen von *Sciara* — aufgestellt und dann auf den ganzen Erscheinungskomplex ausgedehnt worden ist, ohne daß dieser dazu nötige.

Eine besondere Polytäniehypothese haben, ebenfalls auf Grund von Untersuchungen an *Sciara*, RIS und CROUSE vertreten. Während im allgemeinen die Querscheiben als stofflich verschieden von den Zwischenscheiben betrachtet werden und nur den ersten der Besitz von Nukleinsäure zugeschrieben wird, nehmen RIS und CROUSE an, daß die Längselemente der Speicheldrüsenchromosomen in ihrer ganzen Länge gleich-

mäßig färbbar seien und die Unterschiede zwischen Quer- und Zwischen-scheiben nur durch verschiedene Anordnungsarten der Längsabschnitte der homogenen Fibrillen zustande kämen; sie wollen in den Speicheldrüsen-chromosomen mittelgroßer *Sciara*-Larven nur 8 Chromonemen gesehen haben, die wie meiotische Chromosomen doppelt spiralisiert sein sollen. Während die Kleinspirale nur ein welliges Aussehen der Chromonemen be-dinge, soll die Großspiralie dabei durch die Merkwürdigkeit ausgezeichnet sein, daß sie nicht in gleichmäßigem Steigungswinkel das Chromosom durchzieht, sondern daß jeder Windungsumgang einen diagonal und einen genau quer zur Chromosomenachse verlaufenden Abschnitt um-faßt. Da alle Chromonemen genau gleich spiralisiert sind, ihre quer-verlaufenden Windungsabschnitte also auf gleicher Höhe im Chromosom liegen, ist hier im Querscheibenabschnitt die Chromonemenmasse reich-licher vorhanden als in Abschnitten gleichen Volumens aus Chromo-somenstrecken, in denen die Chromonemen diagonal verlaufen. Nach RIS und CROUSE wird auf diese Weise der Unterschied zwischen den chromatischen Querscheiben (quer verlaufende Chromonemastrecken) und den achromatischen Zwischenscheiben (diagonal verlaufende Chromo-nemastrecken) hervorgerufen. Die durch Spiralisierung nach dieser Auf-fassung noch erheblich gesteigerte Länge der Riesenchromosomen wird schlicht durch longitudinales Genwachstum erklärt. Da nach RIS und CROUSE die Spiralisierung auch insofern ungleichförmig ist, als sie das Querscheibenmuster und seinen wechselnden Scheibenabstand herstellt, braucht der Cytogeniker sich mit dieser Hypothese nicht zu befassen. Der Cytologe aber, der zu einer begründeten Strukturauffassung zu kommen wünscht, wird in ihr erhebliche Ungereimtheiten feststellen. Es braucht auf diese zum Teil schon in anderen Kritiken hervorgehobenen Punkte nicht eingegangen zu werden; denn es genügt, auf die oben beschriebenen Strukturverhältnisse im Balbiani-Ring hinzuweisen. Es ist auf dem Boden der RIS-CROUSESCHEN Hypothese unmöglich, die Struktur der feinsten Fibrillenbündel mit einem Durchmesser von Bruchteilen eines Mikrons als Ausdruck einer Spiralisierung eines isochromatischen Fadens hinzustellen; denn die chromomeremartigen Granula sind keine parallel zur optischen Achse laufenden längeren Windungsabschnitte, und wenn man sie als nur kurze derartige Abschnitte ansehen wollte, wäre ihre Masse nicht so sehr verschieden von den sie verbindenden, in der opti-schen Ebene verlaufenden Spiralfadenstrecken, daß diese nicht auf jeden Fall sichtbar werden müßten. Gegen die Gültigkeit dieser Kritik läßt sich nicht einwenden, in den Balbiani-Ringen lägen besondere Struktur-verhältnisse vor; denn in Fällen, wo die Ausbildung der Balbiani-Ring-struktur an diesen Chromosomenabschnitten unterbleibt, zeigen sie ein ganz normales Querscheibenmuster (BEERMANN 1952a, b). Die Autoren meinen: "Proof of our hypothesis rests on a detailed study of the

development of the giant chromosomes." Obwohl auch diese Aussage nicht einleuchtet, kann jedenfalls für *Chironomus* festgestellt werden, daß die Entwicklungsgeschichte keinerlei Anhaltspunkte für die Ausbildung der behaupteten Spiralisierung bietet (BEERMANN 1950, 1952a), und für *Sciara* ist die „proof“ ausgeblieben.

Wenn aus dieser Diskussion das Fazit gezogen wird, kann daran festgehalten werden, daß die Riesenchromosomen hochpolytäne Körper sind, deren an Zahl während des Wachstums zunehmende, submikroskopisch feine Längselemente in — den Quer- und Zwischenscheiben entsprechend — nukleinsäureriche und nukleinsäurefreie (oder sehr -arme) Zonen gegliedert sind, und daß der sichtbare fibrilläre Bau auf einer Aufsplitterung in Teilbündel von Längselementen beruht.

Es bleibt noch die Frage offen, die METZ (1941) und PAINTER (1941) erörtert haben, ob die sichtbaren Fibrillen und Granula (Chromomeren) Ausdruck einer geordneten Gliederung des polytänen Bündels sind und eine Gruppierung der submikroskopischen Längselemente zu Einheiten höherer Ordnung anzeigen, oder ob die Aufspaltung rein statistisch vor sich geht. Die Beobachtungen an den Balbiani-Ringen schließen zum mindesten für die höchsten Stufen (etwa den Bereich der halben ursprünglichen Chromatiden) eine feste Ordnung aus; dazu ist die schrittweise Aufteilung des Chromosoms zu ungleichmäßig. Sie würde z. B. dann anzunehmen sein, wenn die Aufteilung gleichmäßig dichotom erfolgte. Auch für das regelmäßige Vorkommen der großen, aus achromatischem Inneren und chromatischem Mantel bestehenden „Chromomeren“ PAINTER geben unsere Beobachtungen keinen Anhaltspunkt, so daß sie wohl nur als signifikante Artefakte zu deuten sind ebenso wie die „Heterochromomeren“, die von BAUER (1936) als Struktureinheiten beschrieben, von ihm (1938 b) aber wieder zurückgenommen worden sind. Strukturelle Elemente der Fibrillen sind die einer einzelnen Quer- oder Zwischenscheibe entsprechenden Abschnitte, nicht Verbände aus einem Zwischenscheiben- und den beiden angrenzenden Querscheibenabschnitten.

Das generelle Argument von METZ gegen eine hierarchische Ordnung im Riesenchromosom, es würden sich darin gänzlich neuartige, im Mitosechromosom nicht verwirklichte Eigenschaften ausdrücken, hat allerdings in den letzten Jahren durch die sich mehrenden Angaben über einen multiplen Bau auch der letzteren, an Kraft verloren. Denn auch bei diesen muß eine ordnende Beziehung zwischen der Vermehrung der Längselemente und der Aufteilung des Chromosoms in Chromatiden, Halbchromatiden usw. bestehen, von der es denkbar ist, daß sie im wachsenden Polytäncromosom zu höheren Einheiten führt. In dieser Frage ist das letzte Wort noch nicht gesprochen.

Zusammenfassung.

Das 4. Chromosom von *Chironomus tentans* kommt in einer Standard- und einer Inversionsanordnung vor. Die Inversion umfaßt nahezu das ganze Chromosom. In Heterozygoten sind infolge terminaler Paarung am einen Ende nur 2 freie haploide Enden vorhanden. In Bastarden mit *C. pallidivittatus* ist die Paarung der 4. Chromosomen stets (und fast stets ausschließlich) terminal.

In dem Balbiani-Ring des 4. Chromosoms, der in Inversionsheterozygoten von *C. tentans* meistens exzentrisch als fächerförmiger Körper ausgebildet ist, läßt sich mit aller Deutlichkeit die Aufspaltung des polytänen Chromosoms in dickere und dünnerne Fibrillenteilbündel erkennen. Selbst die feinsten Stränge zeigen noch eine Gliederung in gefärbte (chromomerenartige) und ungefärbte Abschnitte. Die beiderseitigen Aufspaltungszenen stehen nicht in sichtbarer Verbindung, woraus auf noch weitergehende Aufspaltung in submikroskopisch dünne Fibrillen im Bereich der Peripherie des Balbiani-Ringes geschlossen wird.

Gegenüber anderen Hypothesen wird die Polytanieauffassung in ihrer einfachen Form aufrechterhalten.

Literatur.

D'ANGELO, E. G.: Micurgical studies on *Chironomus* salivary gland chromosomes. Biol. Bull. **90**, 71—87 (1946). — BAUER, H.: Der Aufbau der Chromosomen aus den Speicheldrüsen von *Chironomus Thummi* KIEFFER. Z. Zellforsch. **23**, 280—313 (1935). — Beiträge zur vergleichenden Morphologie der Speicheldrüsenchromosomen. Zool. Jb. Physiol. **56**, 239—276 (1936). — Cytogenetik. Fortschr. Zool., N. F. **2**, 547—570 (1937). — Die polyploide Natur der Riesenchromosomen. Naturwiss. **26**, 77—78 (1938a). — Cytogenetik (einschließlich Chromosomenforschung). Fortschr. Zool., N. F. **3**, 434—460 (1938b). — Chromosomen und Systematik bei Chironomiden. Arch. f. Hydrobiol. **40**, 994—1008 (1945). — BAUER, H., and T. CASPERSON: Cytochemical observations on nucleolus formation in *Chironomus*. Proc. 8th Internat. Congr. Genetics. Hereditas (Lund) Suppl. **1949**, 533—534. BEERMANN, W.: Chromomerenkonstanz bei *Chironomus*. Naturwiss. **37**, 543—544 (1950). — Chromomerenkonstanz und spezifische Modifikationen der Chromosomenstruktur in der Entwicklung und Organdifferenzierung von *Chironomus tentans*. Chromosoma **5**, im Druck (1952a). — Chromosomenstruktur und Zelldifferenzierung in der Speicheldrüse von *Trichocadius vitripennis*. Z. Naturforsch. **7b**, im Druck (1952b). — BERGER, C. A.: Multiplication and reduction of somatic chromosome groups as a regular developmental process in the mosquito, *Culex pipiens*. Carnegie Inst. Washington Publ. **496**, 209—232 (1938). — BRIDGES, C. B.: Cytological data on chromosome four of *Drosophila melanogaster*. Trans. Dynamics Development (USSR) **10**, 463—473 (1935). — BUCK, J. B., and A. M. MELLAND: Methods of isolating, collecting and orienting salivary gland chromosomes for differentiation analysis. J. Hered. **33**, 3—8 (1942). — CALVIN, M., M. KODANI and R. GOLDSCHMIDT: Effects of certain chemical treatments on the morphology of salivary gland chromosomes and their interpretation. Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A. **26**, 340 bis 349 (1940). — DARLINGTON, C. D.: The working units of heredity. Proc. 8th Internat. Congr. Genetics. Hereditas (Lund) Suppl. **1949**, 189—200. — Physical and

chemical breakage of chromosomes. *Pubbl. Staz. zool. Napoli* **22**, Suppl. 22—31 (1950). — GRELL, SISTER M.: Cytological studies in *Culex* I. Somatic reduction divisions. *Genetics* **31**, 60—76 (1946). — HUGHES-SCHRADER, S.: Cytology of coccids (*Coccoidea-Homoptera*). *Adv. Genetics* **2**, 127—203 (1948). — KODANI, M.: The structure of the salivary gland chromosomes of *Drosophila melanogaster* II. Effects of urea-alkali mixture and other chemicals on the structure of salivary gland chromosomes. *J. Hered.* **32**, 115—133 (1941). — KOLLER, P. C.: The internal mechanics of the chromosomes. IV. Pairing and coiling in salivary gland nuclei of *Drosophila*. *Proc. Roy. Soc. Lond.*, Ser. B **118**, 371—397 (1935). — KOLTZOFF, N. K.: The structure of the chromosomes in the salivary glands of *Drosophila*. *Science* **80**, 312—313 (1934). — KOSSWIG, C. und A. SENGÜN: Neuere Untersuchungen über den Bau der Riesenchromosomen der Dipteren. *Rev. Fac. Sci. Univ. Istanbul* B **12**, 107—121 (1947). — MAINX, F.: The structure of the giant chromosomes in some *Diptera*. *Proc. 8th Internat. Congr. Genetics. Hereditas* (Lund) Suppl. **1949**, 622—623. — MELLAND, A. M.: Types of development of polytene chromosomes. *Proc. Roy. Soc. Edinburgh*, Ser. B **61**, 316—327 (1942). — METZ, C. W.: Structure of salivary gland chromosomes. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* **9**, 23—39 (1941). — PAINTER, T. S.: The structure of salivary gland chromosomes. *Amer. Naturalist* **73**, 315—330 (1939). — An experimental study of salivary chromosomes. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* **9**, 47—54 (1941). — PAINTER, T. S., and A. B. GRIFFEN: The structure and the development of the salivary gland chromosomes of *Simulium*. *Genetics* **22**, 612—633 (1937). — POULSON, D. F., and C. W. METZ: Studies on the structure of nucleolus-forming regions and related structures in the giant salivary gland chromosomes of *Diptera*. *J. of Morph.* **63**, 363—395 (1938). — RIS, H., and H. CROUSE: Structure of the salivary gland chromosomes of *Diptera*. *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.* **31**, 321—327 (1945). — SCHMIDT, W. J.: Einiges über optische Anisotropie und Feinbau von Chromatin und Chromosomen. *Chromosoma* **2**, 86—110 (1941). — SLIZYNSKI, B. M.: Partial breakage of salivary gland chromosomes. *Genetics* **35**, 279—287 (1950). — WHITE, M. J. D.: The cytology of the *Cecidomyiidae* (*Diptera*). I. Polyploidy and Polytene in salivary gland cells of *Lestodiplosis* spp. *J. of Morph.* **78**, 201—219 (1946). — The cytology of the *Cecidomyiidae* (*Diptera*). IV. The salivary-gland chromosomes of several species. *J. of Morph.* **82**, 53—80 (1948).

Prof. Dr. HANS BAUER, Wilhelmshaven,
Max Planck-Institut für Meeresbiologie.

From the Zoological Institute, Hokkaido University, Sapporo, Japan.

A CYTOLOGICAL STUDY OF THE YOSHIDA SARCOMA,
AN ASCITES TUMOR OF WHITE RATS*.

By

SAJIRO MAKINO.

With 94 figures in the text.

(Eingegangen am 8. Oktober 1951.)

A considerable amount of work has previously been published in the field of cancer cytology. A high mitotic rate and a remarkable frequency of mitotic abnormalities have been described as almost universal phenomena in tumors. The older literature has been reviewed by POLITZER (1935). Quite recently, KOLLER (1947), BARIGOZZI and DELLEPIANE (1947), CASABONA (1948), BARIGOZZI (1947), BARIGOZZI and GRATTAROLA (1950), POLLÌ (1950), TIMONEN (1950), TIMONEN and THERMAN (1950), THERMAN and TIMONEN (1950) have made important contributions to the cytology of cancer cells. The attention of most of these authors was attracted by the variation of chromosome numbers, the various types of mitotic aberrations, and related features. The inquiry into the behavior or the karyological changes occurring in them during the growth of the tumor has been neglected, probably because of the difficult material used. Indeed, the tumors in solid form as developed in human bodies or produced spontaneously or experimentally in rats and mice, which have mostly been used by the previous workers, are distinctly unfavourable for the detailed analysis. For this reason, our knowledge of cancer cytology is much less satisfactory than that in other fields of cancer research.

For the present study the Yoshida sarcoma was chosen as material, because it offers several profitable advantages for the cytological investigation. This sarcoma, an ascites tumor growing in the peritoneal cavity of white rats in the form of a fluid malignant tumor, arose in an albino rat which had been fed with O-amidoazotoluene for 3 months and then treated cutaneously with a potassium arsenite solution for about 4 months (YOSHIDA 1949). The tumor ascites is of milky appearance and 1 cmm of it contains approximately one million freely suspended tumor cells. The tumor can easily be maintained by successive transplantations (injecting, with a sharply pointed glass pipette, a small amount of tumor ascites into the peritoneal cavity of a new rat). After transplantation the tumor cells chiefly multiply in the abdominal

* Contribution No. 263 from the Zoological Institute, Faculty of Science, Hokkaido University, Sapporo, Japan.

cavity of the new host. By their larger size and their characteristic features, the tumor cells are clearly distinguished from blood cells occurring in the peritoneal cavity (cf. Figs. 76, 77, 81). This makes microscopical observation extremely easy. Furthermore, the developmental conditions of the tumor cells during the growth of the tumor and the process of their division can easily be studied in a single tumor animal at any time desired, or can be traced successively throughout a whole transplant generation, i. e. the period from inoculation until the death of the tumor animal. Finally, the simple and rapid smear techniques are readily applicable and allow accurate cytological investigation.

Methods.

In the Yoshida sarcoma the cell material can be obtained, without killing or dissecting the rat, simply by puncturing the abdominal cavity with a fine pipette. Smear preparations stained by Giemsa's azureosin-methylenblue solution or by acetocarmine give satisfactory results. For a Giemsa preparation, a drop of tumor ascites is smeared on a slide and fixed with absolute methanol for a few minutes. The slide is then allowed to dry, stained with Giemsa's solution for 40 to 60 min, washed with distilled water, and dried by blotting. For acetocarmine preparations, the fresh ascites smear is directly and immediately covered with acetocarmine. Acetic gentianviolet, advised as a substitute for acetocarmine by TANAKA (1951), can likewise be used with rather excellent results, especially for the study of chromosomes.

The Giemsa preparations are useful for diagnostic observations, since by this method the morphological and physiological characters of tumor cells become clearly evident. But this method causes shrinkage of the cells which then show artificial cohesion and irregular deformation of chromosomes. The acetocarmine and acetic gentianviolet smear methods, however, are excellent for the study of chromosomes. Both, cells and chromosomes are quite free from shrinkage and the chromosomes have well-defined, sharp outlines.

The albino rats (*Rattus norvegicus*) used as hosts for the transmission of the tumor are derivatives of the strain from the Wistar Institute and have been bred pure in our aviary.

Acknowledgement.

The author is happy to offer his sincere expressions of gratitude to Dr. K. OGUMA, Dr. Y. KUWADA and Dr. T. SAKAMURA for their helpful advice and valuable criticism given during the course of this study. The author is also greatly indebted to his co-workers, Mr. T. H. YOSIDA, Mr. T. TANAKA and Miss K. KANÔ for their kind assistance without which the present study would not have been completed. Financial aid from both the „Kagakukenkôhi“ and the „Kagakushikenkyûhi“ granted by the Ministry of Education is also gratefully acknowledged here. Further cordial thanks are due to Dr. H. BAUER for his kind aid in connection with publication. Financial aid defrayed by Mrs. HARUKO KANBA is also acknowledged here.

General course of the growth of the Yoshida sarcoma in a transplant generation.

After intraperitoneal inoculation the ascites sarcoma grows rapidly in the new host and causes the death of the diseased animal in 12 days

on the average. Of the newly implanted tumor cells a large number seem to undergo degeneration, since cells in stages of disintegration and others showing various abnormalities appear with a high frequency, while dividing tumor cells are very few. The majority of the degenerating cells are of large size. Intermingled with them are a number of cells in resting stage, having a small amount of cytoplasm and a spherical nucleus of compact appearance. These resting cells begin to divide about 24 hours after transplantation. The number of dividing cells then increases until they are most numerous in the middle part of the life span of the tumor animal. From then on they gradually begin to decrease in number. In correlation with this decrease of normally dividing cells, cells showing mitotic abnormalities or disintegration changes become more frequent, while proportionally the tumor ascites augments remarkably. Towards the last day of the animal's life there is a sudden final decrease of the number of normal division stages, but, in striking contrast, abnormal or disintegrating cells are abundantly frequent. By this time the accumulation of tumor ascites reaches an enormous amount and causes a large expansion of the abdomen. Having reached this stage, the malignant growth of the tumor leads to the death of the diseased animal. By intraperitoneal transmission of the tumor ascites into a new rat, the tumor cells again begin multiplication and start another cycle.

Observations.

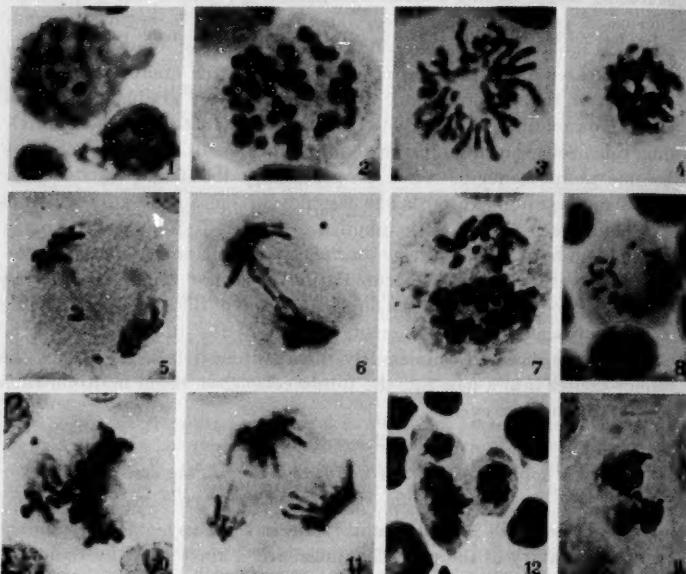
1. Mitotic abnormalities in tumor cells and the occurrence of well-balanced subdiploid tumor cells.

The tumor cells are considerably larger than any other cells in the peritoneal cavity of the rat. The nuclei are characterized by their oval or kidney shape, sometimes they are bilobed. They are situated on one side of the cell (Fig. 1). Two or more conspicuous bodies, probably of nucleolar nature, are visible within the nucleus. In the cytoplasm, distinct azurophilic granules, arranged in a characteristic rosette form, become visible after staining with Giemsa's solution.

As in other tumors, the abnormal mitoses observable throughout a tumor transplant generation in a wide variation in details of type are remarkable cytological phenomena which can be classified in two main categories¹: (i) abnormalities involving structural alterations of the chromosomes, and (ii) abnormalities attributable to accelerated, suppressed, delayed, or incomplete spindle formation. To the first category belong: stickiness and coalescence of chromosomes, abnormal swelling or vacuolization of chromosomes, deformation of chromosomes into

¹ For morphological details of these mitotic abnormalities comp. MAKINO and YOSIDA (1951).

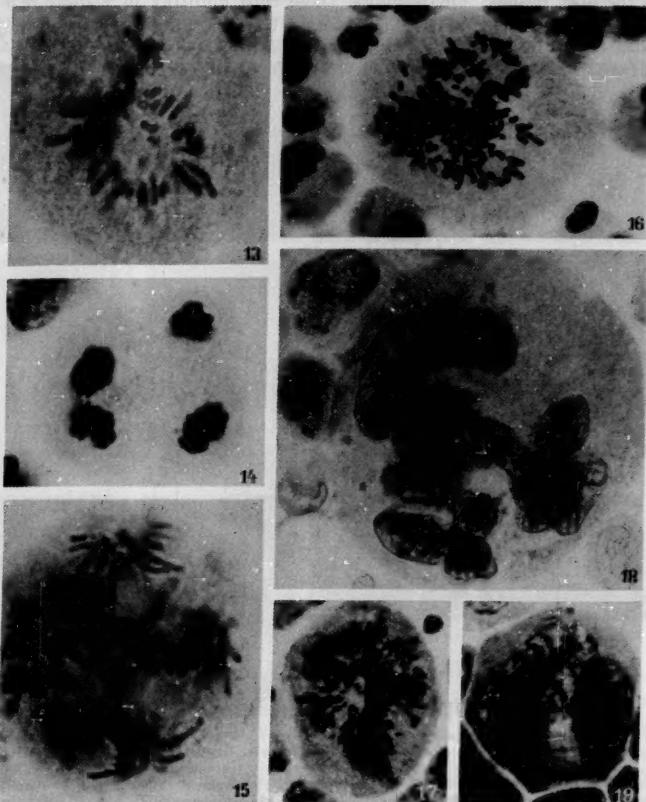
unusual, irregular bodies, and disintegration of spiral chromonemata in the chromosomes. The second category comprises: lagging of chromosomes at anaphase, non-disjunction, chromosome bridges at anaphase and telophase, irregular chromosome distribution at anaphase, hollow metaphase, scattering or displacement of chromosomes at metaphase,



Figs. 1—12. Photomicrographs of Yoshida sarcoma cells. Fig. 1, tumor cells at resting stage showing several nucleoli. Feulgen technique. Fig. 2, irregular swelling of chromosomes into round form. Fig. 3, disintegration of chromonemata spirals, showing vacuolization. Fig. 4, coalescence of chromosomes. Fig. 5, lagging of chromosomes at anaphase. Fig. 6, chromosome bridges at anaphase. Fig. 7, showing some chromosomes extruded outside the equatorial plate. Fig. 8, irregular arrangement of chromosomes at metaphase. Fig. 9, formation of restitution nucleus. Fig. 10, tripolar spindle. Fig. 11, tripolar mitosis. Fig. 12, pentapolar telophase, resulting in the formation of a tetra-nucleate cell and a single nucleate cell. Figs. 1, 8, 12: 900 \times . Figs. 2—7, 9—11: 1200 \times .

exclusion of some chromosomes from the equatorial plate, abnormal orientation of chromosomes at metaphase, formation of restitution nuclei and of multinucleate cells, and multipolar mitoses. Almost all of these abnormalities contribute directly or indirectly to the observable variation of chromosome numbers, finally resulting in highly complex multiple sets of chromosomes, as they can be seen in the giant cells. A series of photomicrographs illustrating the different types of abnormal divisions is given in Figs. 2 to 19.

As mentioned above, the abnormalities concern the chromosomes, or the spindle, or both. Undoubtedly, most of them lead to degeneration and death of the cells. It seems clear that cells which are undergoing

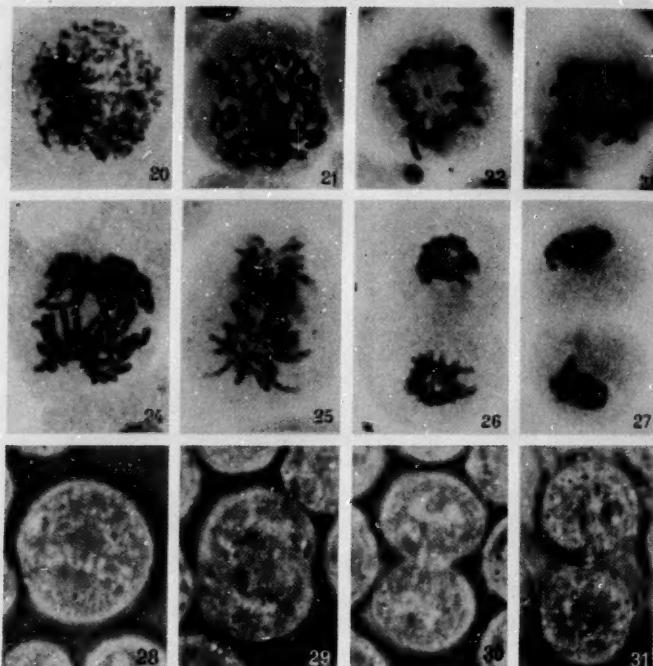


Figs. 13-19. Photomicrographs of Yoshida sarcoma cells. Fig. 13, tetrapolar mitosis. Fig. 14, quadrupolar telophase. Fig. 15, octopolar mitosis. Fig. 16, giant cell containing about 250 chromosomes. Fig. 17, giant cell showing stickiness of chromosomes and their transformation into amorphous masses. Fig. 18, giant cell showing lobulated nuclei. Fig. 19, trinucleate cell. Figs. 13-15: 1200 \times . Figs. 16-19: 600 \times .

abnormal mitosis cannot pursue active multiplication and, hence, they contribute little to the growth of the tumor.

It is therefore an important and noteworthy fact that, besides cells showing abnormal mitotic behavior, there is present a group of tumor

cells which possess a chromosome number of around 40 and which are highly frequent. Since the somatic chromosome number of the rat is 42, these tumor cells contain approximately the same diploid number as the host tissues. Furthermore, these cells multiply in a quite regular mitotic manner. The chromosomal behavior in these cells during



Figs. 20—31. Photomicrographs of Yoshida sarcoma cells. Figs. 20—27, successive stages of mitotic division of well-balanced subdiploid cells (strain cells), showing regular behavior of chromosomes in the course of separation. (Acetocarmine preparation.) Fig. 20, early prophase. Fig. 21, late prophase. Fig. 22, metaphase. Fig. 23, early anaphase. Fig. 24, late anaphase. Fig. 25, telophase. Fig. 26, telophase late. Fig. 27, division of cell body. Figs. 28—31, successive stages of regular mitotic division in a single living tumor cell observed with the phase-contrast microscope. Figs. 20—27: 1200 \times . Figs. 28 to 31: 1000 \times .

division is normal without any evidence of aberration, as is shown in Figs. 20 to 27. Figs. 28 to 31 represent successive stages of the regular mitotic division in a single living cell, observed with the phase-contrast microscope.

The chromosome complex of these normally dividing tumor cells is very characteristic. It comprises two morphologically distinct groups

of chromosomes (Figs. 44 to 51). One of these consists of rod-shaped elements varying in number from 22 to 24, while the other group consists of 18 to 16 J- or V-shaped elements of different sizes. Because the ordinary tissue cells of the white rat consistently contain 42 chromosomes, all of which are rod-shaped¹, the chromosome constitution of the tumor cells is sharply contrasted to that of the normal host cells. Types of chromosome sets transitional between those of normal and of tumor cells have never been detected in our observations.

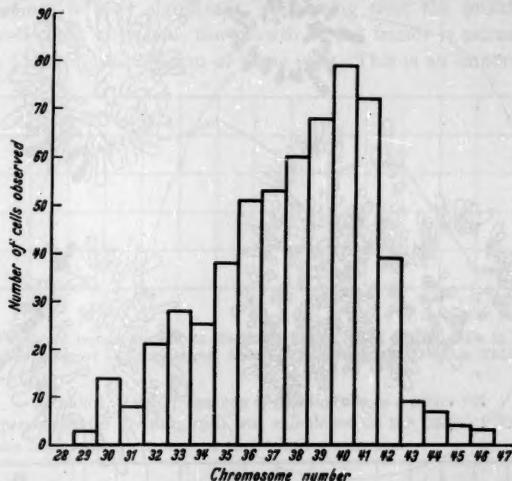


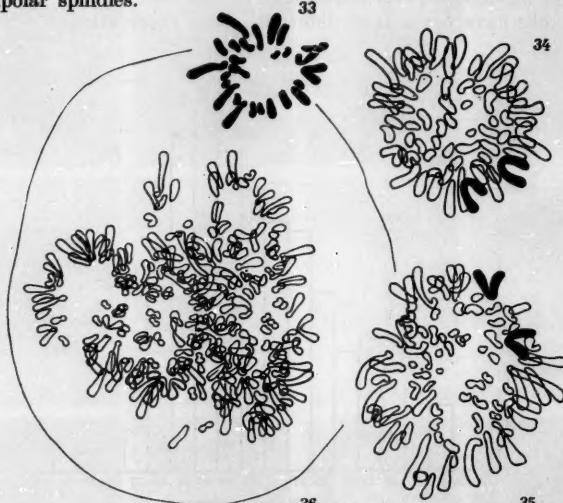
Fig. 32. Diagram showing the variation of chromosome numbers and the distribution of cells with various numbers. From the results of the daily observations throughout a transplant generation of a tumor rat.

The chromosome number varies around 40, showing a rather gradual fluctuation both above and below that number² (Fig. 32). The values found as extremes of the numerical variation have been around 20 as the lowest numbers (Fig. 33) and more or less than 85 as the highest ones (Fig. 35), excepting cases of giant cells (Fig. 36) or of unbalanced hyperploid cells. However, cells containing 37, 38, 39, 40 and 41 chromosomes occur with highest frequencies (Fig. 32). Among them cells having 40 chromosomes are most numerous, and those with 41 chromosomes rank second. These facts indicate that the cells with these chromosome numbers have a mitotic capacity exceeding that of other cells. It is also remarkable that cells with chromosome numbers lower than ± 40 are more frequent than those with numbers larger than

¹ Detailed descriptions of the chromosome sets will be given on pages 659 to 662.

² For details on chromosome numbers, comp. MAKINO and KANÔ (1951).

± 40 . True polyploidy seems to be very rare or absent, but cases of subtriploidy with ± 60 and of subtetraploidy with ± 80 chromosomes are observed, although very rarely (Figs. 34, 35). Giant cells with a very high number of chromosomes (about 200 or more) occur occasionally (Fig. 16, 36), but exact counting was impossible in these cells, since they show abnormal metaphase orientation of chromosomes or multipolar spindles.



Figs. 33—36. Chromosomes of Yoshida sarcoma cells. Camera-lucida drawings. Fig. 33, 26 chromosomes. Fig. 34, 64 chromosomes (subtriploid). Fig. 35, 81 chromosomes (subtetraploid). Fig. 36, a giant cell showing about 250 chromosomes. Figs. 33—35: ca. 1700 \times . Fig. 36: ca. 1200 \times .

2. The rate of mitosis in a transplant generation and the behavior of tumor cells with subdiploid chromosomes.

The daily frequency of the normally dividing tumor cells with well-balanced subdiploid chromosome number and of cells showing mitotic abnormalities furnishes a significant fact with regard to the growth of the tumor. The frequency of normal cell divisions gradually increases from the early towards the middle part of the life span of the tumor animal, but decreases from then on. Cells with mitotic abnormalities, however, are the most frequent ones during the middle part and decrease in frequency towards the latter part, while disintegrating cells are exclusively high in frequency in the latter part of the life span. Thus, active multiplication of the cells with subdiploid chromosome number takes place from the early part to the middle part of a trans-

plant generation. Then they gradually decrease in number, while, correlated with this decrease, cells showing mitotic abnormalities and disintegration increase in frequency, and the tumor ascites accumulates proportionally.

Since, obviously, cells with mitotic abnormalities or in disintegration are unable to continue division much longer, the occurrence of a tumor cell type dividing regularly with a well-balanced subdiploid set of chromosomes is very significant, suggesting that the proliferation of tumor cells and, therefore, the growth of the tumor is primarily attributable to the multiplication of these cells. This is an important point

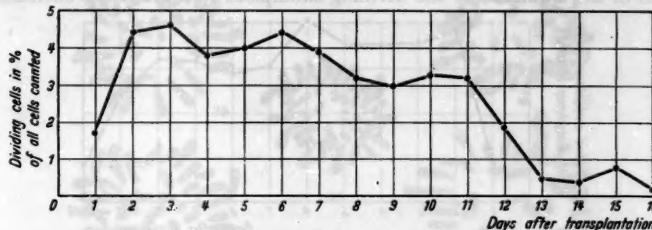


Fig. 37. Graphical representation of the daily frequency of mitotic cells in a transplant generation of the tumor rat, based on the data presented in Table 1.

Table 1. *Daily frequency of mitotic cells in a tumor rat.*

The percentage of dividing cells was calculated on the basis of 2000 cells per day in the observation through a transplant generation.

Days after transplantation . .	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16
Present of dividing cells . .	1.7	4.4	4.6	3.8	4.0	4.4	3.9	3.2	3.0	3.3	3.2	2.1	0.5	0.4	0.8	0.2

in connection with the mechanism of malignant growth and demands further confirmation which was obtained from quantitative observations of the mitotic rate of tumor cells with particular attention to the behavior of the cells with subdiploid chromosome number.

In a specimen which died on the 16th day after transplantation of the tumor, 2000 tumor cells were analyzed every day throughout the entire period of the host's life and the daily frequency of dividing cells including those in late prophase, metaphase, anaphase, and telophase was calculated. The results are summarized in Table 1 and Fig. 37. From these data it is evident that the number of dividing cells increases in the early phase, remains nearly constant throughout the middle part, and decreases rather suddenly towards the end of the tumor animal's life.

The same material was used for an analysis of the frequencies of the different cell types in metaphase stage, registering separately the subdiploid cells with normal metaphase configuration and two types of cells with abnormal metaphases. The data summarized in Table 2 and Fig. 38 indicate that on the first day after transplantation dividing subdiploid cells are rather scarce among all metaphases observed. Their frequency increases considerably during the next days, until, on the 5th to 7th day, they represent more than one third of cells in metaphase. By this time the most active growth of the tumor is attained and the tumor ascites pronouncedly accumulated. From then on towards the end of the animal's life the dividing subdiploid cells gradually decrease

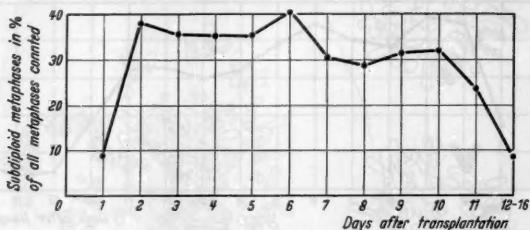


Fig. 38. Graphical representation of the daily frequency of well-balanced subdiploid cells at metaphase, observed through a transplant generation, based on the data presented in Table 2. From the same material as used in Table 1 and Fig. 37.

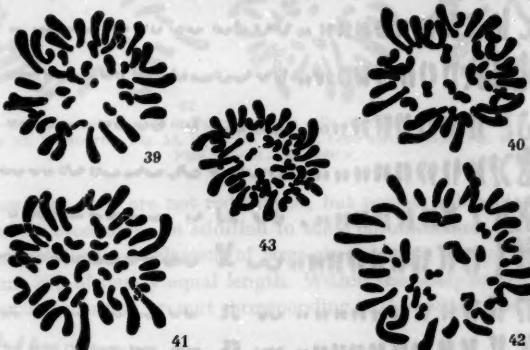
Table 2. *Daily frequency of the cells at metaphase, based on the same material as given in Table 1.*

The percentage was calculated on the basis of the total number of metaphase cells observed every day.

Days after transplantation	Subdiploid cells at metaphase		Irregular cells at metaphase		Disintegrating cells at metaphase		Total number of metaphase cells observed
	Number	%	Number	%	Number	%	
1	18	9.0	60	30.0	122	61.0	200
2	92	38.3	124	51.7	24	10.0	240
3	86	35.8	125	52.1	29	12.1	240
4	79	35.6	111	50.0	32	14.4	222
5	80	35.6	100	44.4	45	20.0	225
6	104	40.5	106	41.2	47	18.3	257
7	57	30.8	75	40.6	53	28.6	185
8	40	29.0	42	30.4	56	40.6	138
9	65	31.7	104	50.7	36	17.6	205
10	90	32.3	127	45.7	61	22.0	278
11	50	23.6	64	30.2	98	46.2	212
12-16	15	8.5	71	42.5	81	45.5	167

in number and are replaced by cells with mitotic abnormalities. On the 11th day, or later, cells showing stickiness or coalescence or disorganization of chromosomes are very frequent, in contrast to the normally dividing subdiploid cells.

From a comparison of Tables 1 and 2 it is apparent that the two sets of data run closely parallel. Both show an increase in the first days, more or less constancy during the middle part, and a decrease towards the end of the transplant generation. As is obvious, the cells showing mitotic abnormalities are unable to continue multiplication and cannot contribute much to the growth of the tumor, therefore the conclusion is warranted from the comparison of the data presented in Table 1 (and Fig. 37) and Table 2 (and Fig. 38) that among the dividing cells those with well-balanced subdiploid chromosome number play



Figs. 39—43. Chromosomes of the strain cells of Yoshida sarcoma, showing a well-balanced subdiploid complex. Camera lucida drawings, ca. 1700 \times . Fig. 39, 38 chromosomes. Fig. 40, 40 chromosomes. Fig. 41, 41 chromosomes. Fig. 42, 42 chromosomes. Fig. 43, 43 chromosomes.

a decisive rôle in the growth of the tumor. It is to them that the multiplication of tumor cells in successive transplant generations is primarily attributable. In the course of multiplication, part of these tumor strain cells become abnormal through aberrant mitotic processes, probably due to an alteration of the normal spindle mechanism, structural changes of chromosomes, and other causes, as emphasized by WADA (1951). Thus, the cells showing various mitotic abnormalities which are so common and characteristic are only derivatives of the normally dividing strain cells¹.

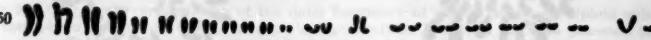
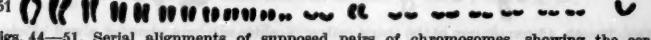
3. Morphological analysis of the chromosomes in the strain cells.

As already briefly stated, the tumor strain cells are characterized by a sub-diploid complex of chromosomes fluctuating in number around 40. Figs. 39 to 43 give some examples of metaphases with 38, 40, 41, 42, and 43 chromosomes respectively. The chromosomes are arranged

¹ In this respect, the detailed accounts have been given by MAKINO and YOSIDA (1951) and MAKINO and KANÔ (1951).

in the normal radial manner, the larger ones occupy peripheral positions surrounding the smaller ones. Neither in the orientation of the chromosomes, nor in the spindle formation is there anything unusual. However, in comparison to the normal chromosome complex of white rats with only rod-shaped elements, the chromosome complex of the tumor strain cells looks very motley because of the presence of V- and J-shaped elements of various shapes and sizes.

In a number of cells, the chromosomes were classified according to their characteristic shapes and sizes and arranged in a series of pairs of

44  V
 45  V
 46  V
 47  V
 48  V
 49  V
 50  V
 51  V

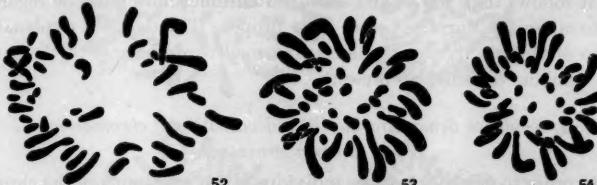
Figs. 44—51. Serial alignments of supposed pairs of chromosomes, showing the constituent elements of well-balanced subdiploid tumor cells of Yoshida sarcoma (strain cells).

In each, 22—24 elements are rod-shaped and 16—18 are V- and J-shaped.

decreasing size. Pairs may represent the two homologues, though they probably do not. Examples of such serial alignments are given in Fig. 44 to 51. From these it is evident that, disregarding the variation in chromosome number, there is a clear-cut distinction of two chromosome groups, one consisting of rod-shaped elements and the other of V- or J-shaped ones, both of varying sizes. It is probable that there are 12 pairs of rods, though in some cases a chromosome is lacking or exists in excess, probably due to non-disjunction, lagging, or some similar irregularities. These rod-shaped chromosomes represent a smoothly graded size-series ranging from very long to small ones. All of them, except the few smallest ones, are of considerable size. Sometimes, certain of the larger chromosomes show at their proximal end a globular thickening or are slightly bent, but it cannot be said with certainty whether these chromosomes have subterminal kinetochores or not. I prefer to consider them as rod-shaped chromosomes.

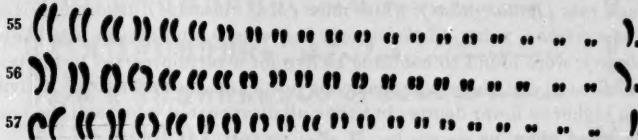
The other chromosome group of V- and J-shaped elements consists of eight, nine, or occasionally ten pairs. It is, however, quite uncertain

whether the members of a pair are really homologous mates. The larger two or three pairs are clearly recognizable by their distinct configuration as V- or J-shaped bodies, while the remaining chromosomes are small without distinct characteristics, all showing an apparent constriction in their middle or near one end. Although they are not sharply bent at the constrictions, the constant presence of the constrictions favors the



Figs. 52—54. Chromosomes of ordinary somatic cells of white rats. Camera-lucida drawings. Fig. 52, monocyte. Fig. 53, liver cell. Fig. 54, bone marrow cell. Fig. 42: ca. 1250 \times . Figs. 43—44: ca. 1700 \times .

inference that they are not rod-shaped, but possess submedian or sub-terminal kinetochores. In addition to these chromosomes, there occurs a prominent V-shaped element of large size which is always single. Its two arms are of nearly equal length. Within the complement there is no other chromosome present corresponding to it in either size or shape.



Figs. 55—57. Serial alignments of supposed pairs of ordinary somatic chromosomes, showing 21 pairs in each. Fig. 55, bone-marrow cell. Fig. 56, liver cell. Fig. 57, amnion cell.

The comparison of these chromosomes of tumor strain cells with those of ordinary tissue cells discloses the marked difference between both. The chromosomes of the Wistar white rats have been investigated in germ cells by MAKINO (1942, 1943) and in various somatic cells by TANAKA (1951). In both studies the basic diploid chromosome number has been established as consistently 42. The chromosomes, both in germ cells and in tissue cells, have always simple rod-shape, tapering towards the inner end (Figs. 52—54). No evidence has ever been found of the presence of even a single V- or J-shaped element, as becomes specially plain from serial alignments of the chromosome pairs (Figs. 55 to 57). If now these figures are compared with Figs. 44—51, the morphological difference of chromosomes from normal and from tumor cells is at once quite evident. A comparison in detail shows that, based

on the apparent likeness in morphological features, the 12 pairs of rod-shaped chromosomes occurring in tumor cells seem to correspond to 12 of the 21 pairs of normal cells. In other words, the rod-shaped chromosomes found in tumor cells have in all probability originated directly from normal rat chromosomes. However, as one fails to find any V- or J-shaped chromosomes in ordinary tissue cells of the white rat, it follows that the V- and J-shaped chromosomes must be regarded as characteristic for the tumor cells proper. The detailed explanation of the origin and nature of these two-armed chromosomes of the tumor cells remains difficult at present.

4. Evidence demonstrating the individuality of chromosomes in the sarcoma strain cells¹.

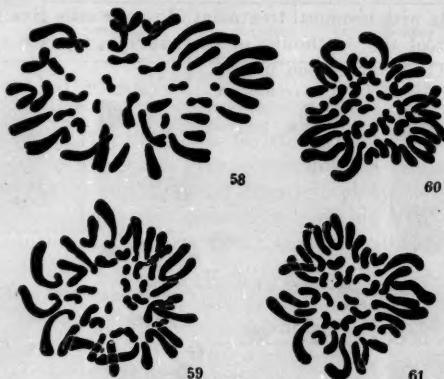
In order to demonstrate the individuality or constancy of the chromosomes in these tumor cells, some experiments were performed to test whether the chromosomes remain unaltered or show changes when brought into abnormal condition. Tumor cells were transplanted into several different heterogeneous hosts, or subjected to the influence of chemicals.

It has been proved that the malignant growth of the Yoshida sarcoma is remarkably host-specific for white rats (YOSHIDA 1949). Tumor cells of white rats transplanted into hosts related to white rats, such as black rats (*Rattus rattus*), white mice (*Mus musculus*), field mice (*Apodemus geisha*), voles (*Clethrionomys bedfordiae*), and guinea pigs (*Cavia cobaya*), were found to continue to live for a certain period in the peritoneal cavity of these heterogeneous hosts and showed mitotic activity to a higher or lower degree, but they all disappeared later, and the hosts remained alive.

The chromosomes were analyzed in tumor cells after such heteroplastic transplantations. Figs. 58—61 represent metaphase plates from tumor cells heteroplastically transplanted into white mice, field mice, voles, and guinea pigs respectively. They show chromosome numbers from 38 to 42. Morphologically, the chromosomes are strikingly similar to those from tumor cells from the normal host, the white rat. More clearly than any verbal description this fact is demonstrated by the serial alignments given in Figs. 62—70 which show the striking uniformity of chromosome sets in cells taken from the different heterogeneous hosts. In every case, the characteristic chromosome constitution of the original Yoshida sarcoma cells can be found, a fact which becomes quite evident by comparing these figures (Figs. 62—70) with Figs. 44—51 from homoplastic transplantations. The similarity between

¹ Detailed data on the individuality of chromosomes in the Yoshida sarcoma cells are given by MAKINO (1952).

chromosomes from heteroplastically transplanted tumor cells and those from homoplastically transplanted cells concerns numerical as well as morphological relations.



Figs. 58—61. Chromosomes of Yoshida sarcoma cells transplanted in the mouse (*Mus musculus*). Fig. 58, 41 chromosomes, field mouse (*Apodemus geisha*, Fig. 59, 41 chromosomes), vole (*Clethrionomys bedfordiae*, Fig. 60, 42 chromosomes) and guinea pig (*Cavia cobaya*, Fig. 61, 42 chromosomes). Camera-lucida drawings, ca. 1700 \times .

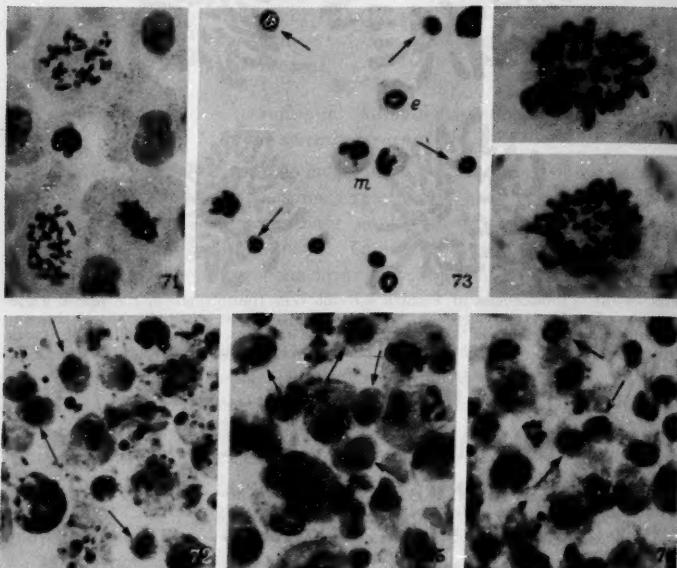


Figs. 62—70. Serial alignments of supposed pairs of chromosomes of Yoshida sarcoma cells, transplanted in heterogeneous hosts. 22—24 elements are rod-shaped and 16—18 elements are V- and J-shaped. Fig. 62, from the black rat transplantation. Figs. 63—64, from the mouse transplantation. Figs. 65—66, from the field mouse transplantation. Figs. 67—68, from the vole transplantation. Figs. 69—70, from the guinea pig transplantation.

Obviously, this similarity implies that the tumor cells dividing in the peritoneal cavity of a heterogeneous host after heteroplastic transplantation are those which come from the white rat. It is thus evident that

tumor cells of the Yoshida sarcoma have remained unchanged in their chromosomal individuality through succeeding transplant generations and also in cases of heteroplastic transplantations.

The results with chemical treatment of tumor cells give further convincing proof of the continuity of the subdiploid strain cells. Podophyllin and CaCl_2 have been used.



Figs. 71-77. Figs. 71-74. From: podophyllin experiments. Fig. 71, abnormal condensation and irregular agglutination of chromosomes of tumor cells, 15 min. after injection of podophyllin. Fig. 72, disintegration of tumor cells. Small-sized cells remain unaffected (indicated by arrows), 10 hours after injection of podophyllin. Fig. 73, 24 hours after injection of podophyllin. Most of the destroyed tumor cells are resorbed, and small-sized tumor cells have remained unaffected (indicated by arrows). *m*: monocyte. *e*: eosinophilic leucocyte. Fig. 74, metaphase plate of a tumor cell, showing subdiploid chromosomes, observed 4 days after injection of podophyllin. Figs. 75-77, from CaCl_2 experiments. Fig. 75, destruction of tumor cells, 1 hour after injection of CaCl_2 . Tumor cells of small size have remained unaffected (indicated by arrows). Fig. 76, the same, 6 hours after injection of CaCl_2 , small tumor cells remaining unaffected (indicated by arrows). Fig. 77, metaphase plate of a tumor cell, subdiploid chromosomes, observed 10 hours after injection of CaCl_2 .
 Figs. 71 to 72, 75-76: 400 \times . Fig. 73: 200 \times . Figs. 74-77: ca. 1200 \times .

Podophyllin¹ acts as a poison damaging the cells at metaphase. In podophyllin-treated cells division is arrested at metaphase and the chromosomes swell and fuse into several irregular masses distributed in

¹ The author is greatly indebted to Dr. I. CORNMAN of George Washington University Cancer Clinic for supplying this drug and for his helpful advices.

Table 3. *Results of observations on dividing cells in the tumor ascites, on 4 days after injection of 0.1% podophyllin in glucose solution.*

No. of subdiploid cells with ± 40 chroms.	No. of abnormal cells			Total
	Stickiness of chroms., ± 40 in number	3-polar	4-polar	
251 (72.13 %)	81 (23.28 %)	9 (2.59 %)	7 (2.01 %)	348

the cytoplasm (Fig. 71). The cells die later. In our experiment 1 cc of 0.1% podophyllin solution in glucose was injected into the peritoneal cavity of a tumor rat on the 6th day after transplantation, that is in the middle part of the transplant generation¹. Within 30 to 40 min. after injection, disturbed mitotic figures can be observed in the tumor cells (Fig. 71). The number of disintegrating cells increases with time. At about 10 or more hours after injection, there are present in the tumor ascites many degenerating tumor cells and together with them a number of tumor cells at the resting stage characterized by a small amount of cytoplasm and single, well-defined compact nuclei (Fig. 72). The tumor cells which have remained unaffected or free from the action of the drug (Fig. 73) begin a period of active division by normal mitosis about three days after the injection. At that time, a large portion of the dividing cells was found to belong to the subdiploid cell type with approximately 40 chromosomes of the shape characteristic for the strain cells (Fig. 74). Numerical data illustrating these facts are summarized in Table 3.

A similar result as with podophyllin was obtained in an experiment with CaCl_2 solution². By injection of 2 cc of a 0.25 M solution into the peritoneal cavity of the tumor rat, a major part of tumor cells with various mitotic abnormalities was destroyed as a result of dehydration (Fig. 75, 76). The unaffected tumor cells begin to divide about 60 or more minutes after the injection. At that time, almost all the dividing cells could be classified as belonging to the strain cells with their characteristic chromosome complement (Fig. 77), as is demonstrated by the data in Table 4.

In conclusion it can be emphasized on the basis of the experiments described in this section that in the Yoshida sarcoma there is present a

¹ A detailed account of this experiment will be published elsewhere by MAKINO and TANAKA.

² The results of this experiment will be published elsewhere with detailed data by MAKINO and TANAKA.

Table 4. *Results of observations on dividing cells in the tumor ascites, at 60 min. after injection of 0.25 M CaCl_2 -solution.*

No. of subdiploid cells with ± 40 chroms.	No. of abnormal cells	Total
62 (92 %)	5 (8 %)	67

definite strain of tumor cells having their own characteristic chromosome constitution and maintaining malignancy as well as inherited capacity for autonomous growth. Their chromosomal individuality has remained unchanged through the transplant generations from host to host, probably since they first became established in the original tumor animal. The growth of the tumor is primarily due to the proliferation of these tumor strain cells.

5. Additional data on the behavior of tumor cells during the growth of the Yoshida sarcoma in a transplant generation.

As has been stated above, the majority of the newly transplanted tumor cells degenerate shortly after implantation. Abnormal and disintegrating cells are then found at a high frequency (Fig. 79). Most of these degenerating cells are large, possess a considerable amount of cytoplasm and a non-globular nucleus. Small-sized resting tumor cells with spherical nucleus (Fig. 80) are interspersed among the larger degenerating cells. Division figures are very rare. The numbers of large- and small-sized tumor cells observed in the tumor ascites a few hours after transplantation are given in Table 5.

The resting cells begin to divide at about 20 hours after inoculation. At the same time the number of small-sized cells decreases, as is demonstrated by the data in Table 6. A comparison of the Tables 5 and 6 makes it clear that with the progressive decrease of the small-sized resting cells a gradual increase of dividing cells occurs. It is noteworthy that most of the dividing cells belong to the small-sized class and that their

Table 5. *Numbers of large- and small-sized tumor cells observed in the tumor ascites at a few hours after transplantation.*

No. of large-sized cells ¹	No. of small-sized cells ²	No. of mitotic cells	Total
981 (64.10%)	545 (35.50%)	5 (0.40%)	1535

Table 6. *Numbers of large- and small-sized tumor cells, observed in the tumor ascites at about 26 hours after transplantation.*

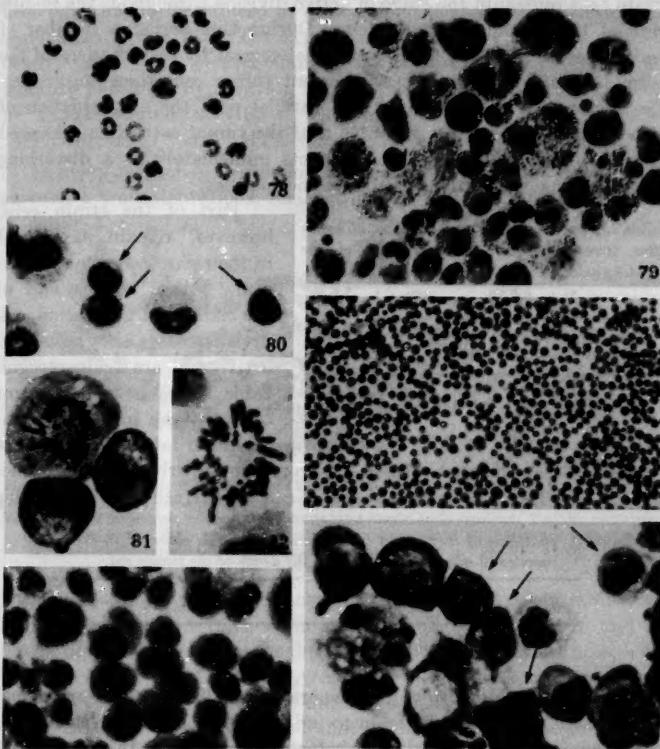
No. of large-sized cells ²	No. of small-sized cells ³	No. of mitotic cells	Total
726 (80.38%)	128 (14.18%)	48 (5.44%)	902

¹ Large-sized cells are tumor cells characterized by a considerable amount of cytoplasm with a large bilobed or multilobulated nucleus. The giant cells are also included.

² Small-sized cells are tumor cells characterized by a small amount of cytoplasm with spherical and compact nucleus.

For³ and⁴, see footnotes given in Table 5.

mitosis reveals the well-balanced subdiploid chromosome complement characteristic of the strain cells (Figs. 81, 82). Table 7 indicates this point most clearly by showing that the majority of dividing cells are



Figs. 78-85. Figs. 78. Normal ascites of white rats, showing monocyte, lymphocytes and eosinophilic leucocytes (300 \times). Fig. 79, tumor ascites at a few hours after transplantation, showing the degeneration of large tumor cells (400 \times). Fig. 80, showing two types of tumor cells, large and small, from the tumor ascites at about 20 hours after transplantation (400 \times). Figs. 81 and 82, metaphase plates of subdiploid tumor cells, from the tumor ascites at about 20 hours after transplantation (Fig. 81: 900 \times . Fig. 82: 1200 \times). Fig. 83, showing active multiplication of tumor cells, from the tumor ascites on the 6th day after transplantation (100 \times). Fig. 84, tumor cells of varying size in inactive condition, from the tumor ascites at a few hours before death of the tumor animal (400 \times). Fig. 85, tumor cells, at the time of death of the tumor animal. Note small-sized tumor cells, indicated by arrows (600 \times).

subdiploid. Thus, it is beyond doubt that the small-sized cells with a small amount of cytoplasm and a compact nucleus are the strain cells.

These strain cells are very actively multiplying on the 3rd and 4th day after transplantation, probably because the peritoneal fluid of the host at this stage serves as a favourable culture medium (Fig. 83). The strain cells remain in the stage of active division throughout the middle part of the transplant generation. During this period a number of derivatives of the strain cells become abnormal by disturbances of the normal mitotic process. These aberrant tumor cells then degenerate. The increase in their number goes parallel with the accumulation of tumor ascites. It is most probable that the tumor ascites has changed into an unfavourable medium and acts immediately as a disturbing agent causing the various mitotic abnormalities.

Table 7. *Types of dividing cells at about 26 hours after transplantation; the majority of the dividing cells are those of subdiploid strain cells.*

No. of mitotic cells		Total
Subdiploid cells (± 40 chroms.)	Aberrant cells (multipolar and hyperploid)	
40 (83.33%)	8 (16.67%)	48

compact nucleus (Figs. 84, 85). They represent a rather large fraction of the tumor cells, as shown by Table 8. From the experiments with podophyllin and CaCl_2 described above it can be derived that the resting

Table 8. *Numbers of large- and small-sized tumor cells observed in the tumor ascites at about 5 hours before the death of the tumor rat.*

No. of large-sized cells ¹	No. of small-sized cells ²	No. of mitotic cells	Total
928 (66.09%)	458 (32.97%)	3 (0.94%)	1389

strain cells are able to resist unfavourable conditions of the surrounding medium. These results seem to indicate that the resting strain cells have acquired in their surfaces protective properties. In other words, the surface of these cells may be provided with a structure not permeable to noxious substances of the medium. Thus protected, the strain cells can remain alive in the presence of unfavourable conditions by transforming themselves into the small-sized resistant form. When they are inoculated into the peritoneal cavity of a new rat, they begin multiplication again under favourable culture conditions and start another cycle. Thus, it follows that the continuity of the Yoshida sarcoma during successive transmissions from rat to rat is performed by the strain cells with their own characteristic chromosomal constitution.

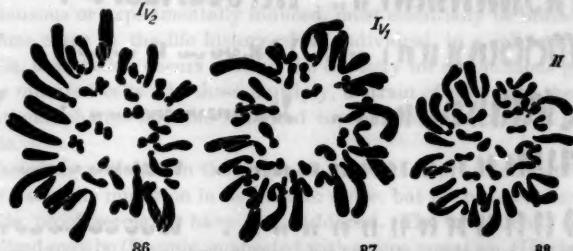
For ¹ and ², see the footnotes given in Table 5.

Part of the strain cells, however, remain unchanged in their chromosome constitution. When, at the end of the transplant generation, cell division ceases, they remain inactive and are again recognizable by their small amount of cytoplasm and their com-

6. The chromosome constitution of tumor cells in 2 new strains of ascites sarcoma similar to the Yoshida sarcoma.

Recently, two new strains of transplantable ascites sarcoma have been experimentally induced in white rats in the author's laboratory by application of azo-dyes. The experimental procedure together with the description of some general characters of these tumors have been preliminarily published by MAKINO, TANAKA, and KANÔ (1951) and in detail by TANAKA and KANÔ (1951). The two new strains have been called „MTK-sarcoma I“ and „MTK-sarcoma II“ respectively.

In every respect — morphological features of the tumor cells, rate of successive transplantations, life-span of the tumor-bearing rat, mitotic



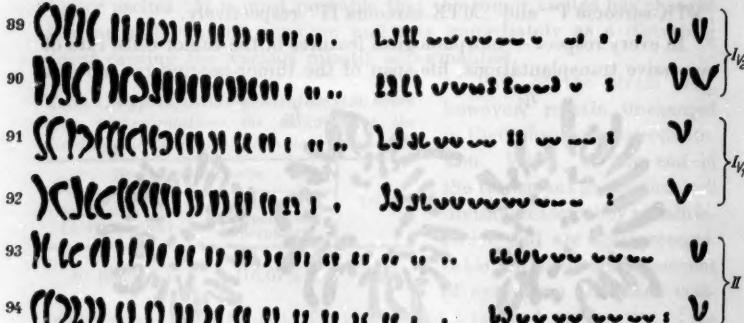
Figs. 86—88. Chromosomes of the MTK-sarcoma I and MTK-sarcoma II. Figs. 86—87, two types of tumor cells occurring in the MTK-sarcoma I. Fig. 86, shows 2 prominent V-elements of large size, while Fig. 87 contains a single such element. For the constituent elements, comp. Figs. 89—92. Fig. 88, metaphase plate of the tumor cell of the MTK-elements sarcoma II. The constituent are shown in Figs. 93—94 ca. 1700 \times .

rate of the tumor cells in a transplant generation, types of mitotic abnormalities in tumor cells, variation of chromosome number, and behavior of the tumor cells throughout a whole life-span of the host — the MTK-sarcomas I and II closely resemble the Yoshida sarcoma. Cytological observations carried out during all phases of a transplant generation of these tumors revealed that there are strains of tumor cells which possess their characteristic chromosome constitution and are the primary contributors to the formation of the tumors.

The chromosomes of these strain cells of the new tumors were analyzed in comparison with those of Yoshida sarcoma. In every case the chromosomes represent a well-balanced subdiploid complement of ± 40 elements. Again, the chromosome complex consists of two distinct groups, one of them comprises rod-shaped chromosomes and the other consists of V- and J-shaped elements varying in size. In the MTK-sarcoma I, however, two different types of tumor strain cells were found to occur, differing in their chromosome complements. One of them is characterized by having from 24 to 26 rod-shaped chromosomes and

from 15 to 17 V- and J-shaped elements (Figs. 87, 91, 92), whereas in the other type of cells in this tumor there are present 23 to 25 rods and 16 to 17 V or J-shaped chromosomes (Figs. 86, 89, 90). In particular, the latter type of cells is very remarkable by possessing two prominent large V-shaped chromosomes (Figs. 89, 90).

The tumor cells of the MTK-sarcoma II are characterized by the presence of fewer V- and J-shaped chromosomes. Their number ranges from 11 to 13, while the other 28 to 30 elements are rod-shaped (Figs. 88, 93, 94).



Figs. 89—94. Serial alignments of supposed pairs of chromosomes of the MTK-sarcoma I and MTK-sarcoma II, showing the constituent elements. Figs. 89—90, from one type of tumor cells occurring in the MTK-sarcoma I, having 2 large, prominent V-elements, 23—25 rod-shaped elements and 16—17 V- and J-shaped ones. Fig. 91—92, from another type of tumor cells in the MTK-sarcoma I, showing a prominent V-element, 24—26 rod-elements and 15 to 17 V- and J-elements. Figs. 93—94, from tumor cells of the MTK-sarcoma II, showing 28—30 rod-shaped elements and 11—13 V- and J-shaped ones.

These findings, together with those on the Yoshida sarcoma, point out clearly that each of the three kinds of ascites sarcoma possesses in its tumor cells its own characteristic chromosome constitution, and that all three are similar in general and deviate in the same way from normal tissue cells of the host. The fact that the chromosome constitution is different and specific according to the strains of the tumors of similar character¹, seems important in connection with the question of how the tumor cells arose or were transformed from ordinary tissue cells, an interesting and quite fundamental question in cancer research.

Theories on the origin of cancer.

The result of the present investigation that in three separately induced sarcomas a strain of tumor cells could be found in each, which have a specific chromosome constitution and are the primary source of the malignant growth, is not paralleled by any other previous study in

¹ Details will be published elsewhere by MAKINO and KANÔ.

the field of cancer cytology. WINGE (1930) who analyzed the change of chromosome number during cancer formation of tar-induced mouse carcinoma, paid no attention to the morphology of the chromosomes.

As an explanation for the origin of the particular chromosome complex of the Yoshida sarcoma cells the occurrence of a chromosomal mutation during the transformation of an ordinary tissue cell into a tumor cell is most probable. This assumption is strongly supported by the finding that two new ascites sarcomas possess strain cells with their own characteristic chromosome constitution which must have had a similar mutational origin.

It has frequently been postulated that the origin of cancer, be it spontaneous or experimentally induced, must essentially be mutational. At some stage in the life history of an individual, in a cell or a group of cells, a mutation occurs causing the capacity for autonomous growth of the mutated cells. As these multiply, a strain of cells with the same mutational change and the inherited capacity for autonomous growth results.

Various hypotheses on the origin of cancer have proposed as primary cause a somatic mutation in its broader sense, but for none of them any definite proof seems to have been adduced. The mutational change visualized may be (I) genic, connected with a gene mutation, (II) chromosomal, resulting from a change in number or structure of chromosomes, (III) heterochromatic, due to a change in heterochromatin, and (IV) plasmatic, involving the assumption of the presence of the so-called plasmagenes in which a permanent change occurred. The first three hypotheses locate the change leading to the development of cancer in the chromosomes, while the fourth postulates that the change takes place in the cytoplasm (TIMONEN and THERMAN 1950).

Since it had early been proposed by BOVERI (1914) and several other workers, the varying chromosome numbers observed in cancer cells have long been assumed to be the cause of their malignancy¹. In fact, cancer cells display a striking variation of chromosome number; for instance, the chromosomes of the Yoshida sarcoma vary over a range from about 20 to over 80, and occasionally to still higher numbers

¹ It should be pointed out here that BOVERI is often incorrectly interpreted. His hypothesis assumes that a cancer cell possesses an unbalanced chromosome complement which arose by an abnormal mitosis in a normal tissue cell, that the growth of the tumor „kann nach meiner Hypothese nur durch reguläre zweipolige Mitosen vor sich gehen“, whereby the same aberrant chromosome constitution is maintained in all daughter tumor cells, and that mitotic abnormalities in these tumor cells give rise to cells with variable chromosome numbers „die aber im allgemeinen damit zugleich den Typus der ursprünglichen Geschwulstzelle verloren haben und neue Typen darstellen von einer freilich zumeist nur sehr beschränkten Lebensfähigkeit“ (BOVERI, l. c., p. 48—49).

in polyploid cells. But on the other hand it should be realized that the chromosome number in normal somatic tissues likewise varies considerably. TANAKA (1951) demonstrated a numerical variation from 36 to 84 of the chromosomes in various tissue cells of young albino rats. Similar observations have been reported by THERMAN and TIMONEN (1951) in various kinds of human somatic cells. On this basis, therefore, the variation of chromosome number alone can hardly be regarded as the ultimate cause of the malignancy of cancer.

The situation of the present author's case is highly different. The chromosome complex of the Yoshida sarcoma cells as well as of those of the two new ascites tumors of similar nature are remarkable in showing a prominent differentiation from that of the host. A number of chromosomes has remained unchanged in comparison with the normal host's chromosomes, while another group have become visibly transformed. Moreover, the individuality of the chromosomes in these tumor cells has remained unaltered through successive transplant generations. Obviously, we are not concerned with a mere numerical change in the chromosome set, but have clear-cut evidence demonstrating that the tumor cell has arisen through a mutational change in the chromosomes of an ordinary tissue cell, a change which probably took place at some stage during the experiment with the carcinogenic agent and enabled the mutated cell to grow autonomously. From the MTK-sarcoma I it can be derived that the mutational change occurred twice, or else in two or more cells, in this case, because two types of tumor cells having different chromosome constitutions have been observed (Figs. 89-92). Mitotic multiplication of the mutated cells then gave rise to the tumor cell strains which, by preserving the characteristic chromosome constitution and the capacity for autonomous growth, are the primary contributors to tumor formation by continued proliferation in successive transplantations. In various respects the tumor cells, thus, simulate rather closely a parasitic organism.

Based on the observation that the nucleic acid metabolism is governed by the heterochromatic parts of the chromosomes, and that malignant cells contain more nucleic acid than normal tissue cells, CASPERSSON and SANTESSON (1942) have postulated that the origin of cancer is to be sought in a change in the heterochromatic portions of the chromosomes. In connection with the present author's findings this view is interesting, since the observed change in shape of the chromosomes may bring about some internal alteration upsetting the normal relations between euchromatin and heterochromatin.

Recent communications published by KOLLER (1947), DARLINGTON (1948), and TIMONEN and THERMAN (1950) have emphasized that the permanent change which renders a cell malignant takes place in the

cytoplasm. This hypothesis is also of interest, but at present a sufficient morphological basis for its critical evaluation is lacking.

From a more general point of view it seems very probable that the origin of cancer cannot be sought in a single cause, that there are several types of cancer differing in nature and in origin, and that there are several causes in the development of cancer.

Summary.

In the Yoshida sarcoma a strain of tumor cells is present which have their own characteristic chromosome constitution and multiply by regular mitosis. The well-balanced complement of ± 40 chromosomes consists of two distinct groups: one is represented by 22 to 24 rod-shaped elements which probably come directly and without change from the original normal cell, the other group comprises 16 to 18 V- and J-shaped chromosomes which are specific for the tumor cells. Their exact origin is unknown, but must be mutational in character. Because of this morphological peculiarity, the chromosomes of the tumor cells are markedly different from those of the host cells for which 42 rod-shaped elements are typical. No transitional types bridging the gap between ordinary and tumor cells occur. The individuality of the chromosomes in the strain cells remains unchanged during successive transplant generations from rat to rat. The growth of the tumor is primarily caused by the proliferation of these strain cells. In the course of multiplication part of the proliferating cells become abnormal and undergo aberrant mitotic processes owing probably to an alteration of the spindle mechanism, structural changes of the chromosomes, and some other causes. The frequently occurring tumor cells showing mitotic abnormalities are, therefore, derivatives of the sub-diploid strain cells. Destruction of the derivative cells by chemical treatment (podophyllin, CaCl_2) is followed by multiplication of the resistant strain cells.

Comparable evidence has been found in two new strains of ascites tumor similar to the Yoshida sarcoma. Their strain cells have the same total chromosome number as the Yoshida strain cells and, within the set, the same two groups of rod-shaped and of V- or J-shaped chromosomes, but differ from each other as well as from the Yoshida sarcoma in the number of V- and J-shaped chromosomes.

Literature cited.

BARIGOZZI, Cl.: Les chromosomes humains dans quelques états pathologiques. Arch. Klaus-Stiftg 22, 342-345 (1947). — BARIGOZZI, Cl., e G. DELLEPIANE: L'indagine cariologica nello studio e nella diagnosi dei tumori maligni. Arch. ital. Anat. Istol. Pat. 20, 357-368 (1947). — BARIGOZZI, Cl., e R. GRATTABORLA: La struttura microscopica del nucleo nella cellula tumorale. Tumori 36, 105-130

(1950). — BOVERI, TH.: Zur Frage der Entstehung maligner Tumoren. Jena: Gustav Fischer 1914. — CASABONA, U.: I fenomeni cromosomici nel tumore da benzopirene del ratto. *Biol. Latina* **1**, 223—232 (1948). — CASPERSSON, T., u. L. SANTESSON: Studies on protein metabolism in the cells of epithelial tumours. *Acta Radiol. Suppl.* **46**, 1—105 (1942). — DARLINGTON, C. D.: The plasmagene theory of the origin of cancer. *Brit. J. Canc.* **2**, 118—126 (1948). — KOLLE, P. CH.: Abnormal mitosis in tumors. *Brit. J. Canc.* **1**, 38—47. — MAKINO, S.: Studies on murine chromosomes. II. Morphological comparison of the chromosomes between the wild form and the domesticated variety of *Rattus norvegicus* BERK. *J. Fac. Sci. Hokkaido Univ., Ser. VI, Zool.* **8**, 31—43 (1942). — Studies on murine chromosomes. III. A comparative study of chromosomes in five species of *Rattus*. *J. Fac. Sci. Hokkaido Univ., Ser. VI, Zool.* **9**, 19—57 (1943). — An atlas of the chromosome numbers in animals. Iowa State Coll. Press 1951a. — Some observations on the chromosomes in the Yoshida sarcoma cells based on the homoplastic and heteroplastic transplantations. (A prel. report.) *Gann* **42**, 87—90 (1951b). — The cycle of tumor cells in a transplant generation of the Yoshida sarcoma. *Proc. Jap. Acad.* **27**, 287—291 (1951c). — Cytological studies on cancer. III. The characteristics and individuality of chromosomes in tumor cells of the Yoshida sarcoma which contribute to the growth of the tumor. *Gann* **43**, 17—34 (1952). — MAKINO, S., and K. KANÔ: Cytological studies on cancer. II. Daily observations on the mitotic frequency and the variation of the chromosome number in tumor cells of the Yoshida sarcoma through a transplant generation. *J. Fac. Sci. Hokkaido Univ., Ser. VI, Zool.* **10**, 225—242 (1951). — MAKINO, S., T. TANAKA and K. KANÔ: Experimental production of the two new ascites tumors similar to the Yoshida sarcoma. *Gann* **42**, 199—201 (1951). — MAKINO, S., and T. H. YOSIDA: Cytological studies on cancer. I. Morphological and statistical observations on the abnormal mitosis in tumor cells of the Yoshida sarcoma through a transplant generation. *J. Fac. Sci. Hokkaido Univ., Ser. VI, Zool.* **10**, 209—224 (1951). — POLITZER, G.: Die Zellteilung im Karzinom. *Wien. klin. Wschr.* **1955**, 1055—1057. — POLLI, E.: The behavior of chromatins in normal and pathological human blood cells. *Exper. Cell. Res.* **1**, 460—472 (1950). — TANAKA, T.: A simple squash technique applicable for the chromosomes of mammalian tissue and tumor cells. *Gann* **42**, 81—85 (1951a). — A study of the somatic chromosomes in various organs of the white rat (*Rattus norvegicus*), especially with regard to the number and its variation. *Papers Coord. Committ. Res. Genet.* **2**, 39—45 (1951b). — TANAKA, T., and K. KANÔ: Cytological studies on cancer. IV. General characters of the MTK-sarcomas, new ascites tumors of rats produced by the administration of azo dye. *J. Fac. Sci. Hokkaido Univ., Ser. VI Zool.* **10**, 289—301 (1951). — THERMAN, E., u. S. TIMONEN: Multipolar spindles in human cancer cells. *Hereditas* (Lund) **36**, 393—405 (1950). — Inconstancy of the human somatic chromosome complement. *Hereditas* (Lund) **37**, 266—279 (1951). — TIMONEN, S.: Mitosis in normal endometrium and genital cancer. *Acta obstetr. scand.* (Stockh.) **31**, Suppl. 2, 1—88 (1950). — TIMONEN, S., and E. THERMAN: The changes in the mitotic mechanism of human cancer cells. *Canc. Res.* **10**, 431—439 (1950). — WADA, B.: The mechanism of mitosis based on studies of the submicroscopic structure and of the living state of the Tradescantia cell. *Cytologia* **16**, 1—26 (1951). — WINGE, O.: Zytologische Untersuchungen über der Natur maligner Tumoren, II. Teekarzinome bei Mäusen. *Z. Zellforsch.* **10**, 683—735 (1930). — YOSHIDA, T.: The Yoshida sarcoma, an ascites tumor. *Gann* **40**, 1—21 (1949).

Prof. Dr. S. MAKINO, Sapporo, Japan,
Zoological Institute, Hokkaido University.

Autorenverzeichnis des 4. Bandes¹.

BAUER, H., und W. BEERMANN, Die Polytanie der Riesenchromosomen. S. 630.

BEERMANN, W., s. BAUER, H. S. 630.

BRYAN, J. H. D., DNA-Protein relations during microsporogenesis of *Tradescantia*. S. 369.

DEUFEL, J., Untersuchungen über den Einfluß von Chemikalien und Röntgenstrahlen auf die Mitose von *Vicia faba*. S. 239.

— Auslösung von Chromosomenmutationen durch Äthylurethan in Abhängigkeit von der Konzentration. S. 611.

FIALA, Y., und J. NEUBERT, Die Erzeugung von Chromosomendislokationen durch Röntgenstrahlen in der Keimbahn und in Geschlechtszellen verschieden Alters bei *Drosophila hydei* STÜRT. S. 577.

GESSNER, B., s. SELLER, J. S. 91.

GOTTSCHALE, W., Untersuchungen am Pachytän normaler und röntgenbestrahlter Pollenmutterzellen von *Solanum lycopersicum*. S. 298.

— Der Vergleich von röntgen- und chemisch induzierten Chromosomenmutationen im Pachytän von *Solanum lycopersicum*. S. 342.

— Das Verhalten der Nucleolen während der Meiosis von *Solanum lycopersicum*. S. 503.

HUGHES-SCHRADER, S., The chromosomes of mantids (*Orthoptera: Mantidae*) in relation to taxonomy. S. 1.

KURABAYASHI, M., s. MATSUURA, H. S. 273.

LEUCHTENBERGER, C., s. SCHRADER, F. S. 404.

MAINX, F., Die Verbreitung von Chromosomendislokationen in natürlichen Populationen von *Liriomyza urophorina* MIK. S. 521.

MAKINO, S., A cytological study of the Yoshida sarcoma, an ascites tumor of white rats. S. 649.

MARQUARDT, H., Die Wirkung der Röntgenstrahlen auf die Chiasmafrequenz in der Meiosis von *Vicia faba*. S. 232.

MATSUURA, H., Chromosome studies on *Trillium kamtschaticum* PALL. and its allies. XXIII. Certain peculiar meiotic configurations. S. 284.

— and M. KURABAYASHI, Chromosome studies on *Trillium kamtschaticum* PALL. and its allies. XXIV. The association of kinetochores of non-homologous chromosomes at meiosis. S. 273.

MIYAO, G., s. YASUZUMI, G., Y. YAMAMOTO und J. YOKOYAMA. S. 359.

MOORE, B. C., Desoxyribose nucleic acid in embryonic diploid and haploid tissues. S. 563.

NARBEL-HOFSTETTER, M., La cytologie de la parthénogénèse chez *Solenobia* sp. (*lichenella* L.?) (Lépidoptères, Psychides). S. 56.

NEUBERT, J., s. FIALA, Y. S. 577.

PARDI, L., I primi processi dello sviluppo nell'uovo fecondato delle razze tetraploidi-parthenogenetiche di *Solenobia triquetrella* F. R. (Lepidoptera-Psychidae). S. 108.

PATAU, K., und R. P. PATIL, Mitotic effects of sodium nucleate in root tips of *Rhoeo discolor* HANCE. S. 470.

PATIL, R. P., s. PATAU, K. S. 470.

POLLI, E. E., The isolated chromosomes from erythrocytes of various species of vertebrates. S. 621.

REITBERGER, A., Chromozentrenuntersuchungen. I. Mitteilung. Über die Struktur junger Ruhekerne verschiedener Valenz bei vier Kruziferarten. S. 205.

SCHRADER, F., and C. LEUCHTENBERGER, The cytology and chemical nature of some constituents of the developing sperm. S. 404.

¹ Das Register für die Bände 2—4 wird zusammen mit dem des nächsten Bandes erscheinen.

SCHUH, J. E., Some effects of colchicine on the metamorphosis of *Culex pipiens* LINN. S. 456.

SEARS, E. R., Misdivision of univalents in common wheat. S. 535.

— The behavior of isochromosomes and telocentrics in wheat. S. 551.

SEILER, J., und B. GESSNER, Die automatischen Vorgänge im Ei der tetraploid parthenogenetischen *Solenobia triquetrella* F. R. (*Psychidae*, Lepid.). S. 91.

SMITH, S. G., The evolution of heterochromatin in the genus *Tribolium* (*Tenebrionidae: Coleoptera*). S. 585.

STICH, H., Das Vorkommen von Kohlenhydraten im Ruhekern und während der Mitose. S. 429.

VISCONTI DI MODRONE BORGHI, L., e N. VISCONTI DI MODRONE, Analisi citologica di batteri nelle varie fasi di accrescimento. S. 393.

VISCONTI DI MODRONE, N., s. VISCONTI DI MODRONE BORGHI, L. S. 393.

WAGNER, E., Cytologische Untersuchungen über Meiose und Pollenentwicklung weiblicher Rebensorten. S. 439.

WOLF, B. E., Die Chromosomen in der Spermatogenese der Dipteren *Phryne* und *Mycetobia*. S. 148.

YAMAMOTO, Y., s. YASUZUMI, G., G. MIYAO und J. YOKOYAMA. S. 359.

YASUZUMI, G., The micro-structure of chromatin threads in the metabolic stage of the nucleus. S. 222.

— G. MIYAO, Y. YAMAMOTO and J. YOKOYAMA, The microstructure and origin of the threadlike bodies isolated from the metabolic nucleus. S. 359.

YOKOYAMA, J., s. YASUZUMI, G., G. MIYAO und Y. YAMAMOTO. S. 359.

